

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 857**

51 Int. Cl.:

C12N 15/24 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2000 E 07119666 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 1897950**

54 Título: **Proteínas GIL-19/AE289 humanas y polinucleótidos que codifican las mismas**

30 Prioridad:

28.04.1999 US 131473 P

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

06.03.2015

73 Titular/es:

**GENETICS INSTITUTE, LLC (100.0%)
87 CAMBRIDGE PARK DRIVE
CAMBRIDGE, MA 02140, US**

72 Inventor/es:

**JACOBS, KENNETH;
SPAULDING, VIKKI y
XUAN, DEJUN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 530 857 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

Proteínas GIL-19/AE289 humanas y polinucleótidos que codifican las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona proteínas novedosas que muestran homología con interleucina 10 (IL-10) y polinucleótidos que codifican tales proteínas, junto con utilidades terapéuticas, de diagnóstico y de investigación para dichos polinucleótidos y proteínas.

Antecedentes de la invención

10 La tecnología dirigida al descubrimiento de factores proteicos (incluyendo por ejemplo, citocinas, tales como linfocinas, interferones, CSF e interleucinas) ha madurado rápidamente durante la última década. Las ahora rutinarias técnicas de clonación por expresión y clonación por hibridación clonan polinucleótidos novedosos "directamente" en el sentido de que se basan en información directamente relacionada con la proteína descubierta (es decir, secuencia parcial de ADN/aminoácidos de la proteína en el caso de la clonación por hibridación; actividad de la proteína en el caso de la clonación por expresión). Por ejemplo, el documento WO00/24758 da a conocer el aislamiento de un ácido nucleico que codifica una citocina referida como factor inducible de células T (TIF), que se regula al alza por interleucina 9. Técnicas más recientes de clonación "indirecta" tales como clonación por secuencia señal, que aísla secuencias de ADN basándose en la presencia de un motivo de secuencia líder secretora ahora bien reconocido, así como diversas técnicas de clonación por hibridación de baja rigurosidad o basadas en PCR, han hecho avanzar el estado de la técnica poniendo a disposición grandes números de secuencias de ADN/aminoácidos para proteínas que se sabe que tienen actividad biológica en virtud de su naturaleza secretada en el caso de la clonación por secuencia líder, o en virtud de la fuente celular o tisular en el caso de las técnicas basadas en PCR. A estas proteínas y los polinucleótidos que las codifican es a los que se refiere la presente invención.

Sumario de la invención

25 En una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es una variante alélica que tiene al menos el 95% de identidad con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1;
 - (b) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601;
 - 30 (c) la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica proteína de longitud total del clon hGIL-19/AE289 depositado con número de acceso ATCC 207231;
 - (d) la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica proteína madura del clon hGIL-19/AE289 depositado con número de acceso ATCC 207231;
 - (e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2; y
 - 35 (f) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 desde el aminoácido 34 hasta el 179 para su uso en terapia o diagnosis,
- en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que induce fosforilación de Stat-3.

También se describe en el presente documento una composición que comprende un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en:

- 40 (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1;
- (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601;
- (c) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de la proteína de longitud completa que codifica la secuencia del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;
- 45 (d) un polinucleótido que codifica la proteína completa codificada por el inserto ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;
- (e) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de una secuencia de proteína madura del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;
- (f) un polinucleótido que codifica una proteína madura codificada por el inserto ADNc del clon hGIL-19/AE289

depositado con el número de acceso ATCC 207231;

(g) un polinucleótido que codifica la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2;

5 ((h) un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 que tiene actividad biológica, comprendiendo el fragmento ocho de aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2;

(i) un polinucleótido que es una variante de alelo de un polinucleótido de (a)-(f), anterior;

(j) un polinucleótido que codifica una especie homóloga de la proteína de (g) o (h), anterior;

(k) un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones astringentes uno cualquiera de los polinucleótidos especificados en (a)-(h);y

10 (l) un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones astringentes uno cualquiera de los polinucleótidos especificados en (a)-(h) y que tiene una longitud que es, al menos, un 25% de la longitud de SEC ID N.º: 1:

15 Preferiblemente, tal polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601; la secuencia de nucleótidos de la secuencia que codifica proteína de longitud completa del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231; o la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica proteína madura del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231 (por ejemplo, nucleótidos 1-1177 de SEC ID N.º: 1). En otras realizaciones preferidas, el polinucleótido codifica la proteína de longitud completa o madura codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231 (por ejemplo, aminoácidos 1-179 de SEC ID N.º: 2). También se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 que tiene actividad biológica, comprendiendo preferiblemente el fragmento ocho (más preferiblemente veinte, lo más preferiblemente treinta) aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2, o un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 que tiene actividad biológica, comprendiendo el fragmento la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 84 hasta el aminoácido 93 de SEC ID N.º: 2.

25 Otras realizaciones proporcionan el gen correspondiente a la secuencia de ADNc de SEC ID N.º: 1.

También se describen en el presente documento polinucleótidos aislados producidos según un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un procedimiento que comprende las etapas de:

30 (i) preparar una o más sondas de polinucleótido que se hibridan en 6X SSC a 65°C con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(aa) SEC ID N.º: 1, pero excluyendo la cola de poli(A) en el extremo 3' de SEC ID N.º: 1; y

(ab) la secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

35 (ii) hibridar dicha(s) sonda(s) con ADN genómico humano en condiciones al menos tan rigurosas como 4X SSC a 50°C; y

(iii) aislar los polinucleótidos de ADN detectados con la(s) sonda(s);

y

(b) un procedimiento que comprende las etapas de:

40 (i) preparar uno o más cebadores de polinucleótido que se hibridan en 6X SSC a 65°C con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(ba) SEC ID N.º: 1, pero excluyendo la cola de poli(A) en el extremo 3' de SEC ID N.º: 1; y

(bb) la secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

45 (ii) hibridar dicho(s) cebador(es) con ADN genómico humano en condiciones al menos tan rigurosas como 4X SSC a 50°C;

(iii) amplificar secuencias de ADN humano; y

(iv) aislar los productos de polinucleótido de la etapa (b)(iii).

Preferiblemente, el polinucleótido aislado según el procedimiento anterior comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADNc de SEC ID N.º: 1 y que se extiende de manera contigua desde una secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' de SEC ID N.º: 1 hasta una secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' de SEC ID N.º: 1, pero excluyendo la cola de poli(A) en el extremo 3' de SEC ID N.º: 1. También preferiblemente, el polinucleótido aislado según el procedimiento anterior comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ADNc de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601 y que se extiende desde una secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' de dicha secuencia de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601, hasta una secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' de dicha secuencia de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601.

También se describe en el presente documento una composición que comprende una proteína, en la que dicha proteína comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2;

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2, comprendiendo el fragmento ocho aminoácidos contiguos de la SEC ID N.º: 2; y

(c) la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

estando la proteína sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero. Tal proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2. También se describe en el presente documento una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 que tiene actividad biológica, comprendiendo preferiblemente el fragmento ocho (más preferiblemente veinte, lo más preferiblemente treinta) aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2.

En ciertas realizaciones preferidas, el polinucleótido está operativamente unido a una secuencia de control de la expresión. También se describe en el presente documento una célula huésped, incluyendo células bacterianas, de levadura, de insectos y de mamíferos, transformadas con tales composiciones de polinucleótido. También se describen en el presente documento organismos que tienen una expresión potenciada, reducida o modificada del/de los gen(es) correspondiente(s) a la secuencia de polinucleótido dada a conocer en el presente documento.

En otra realización, la invención se refiere a una proteína codificada por un polinucleótido según se reivindica en el presente documento.

En una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a una proteína según se reivindica en el presente documento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo neutralizante y se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo con injerto de CDR y un anticuerpo humanizado. También puede ser un anticuerpo humano.

En aún otra realización, la invención se refiere al uso de un anticuerpo según se reivindica en el presente documento para tratar o evitar artritis. En una realización, la artritis es artritis reumatoide.

También se describen procedimientos para producir una proteína, que comprenden:

(a) hacer crecer un cultivo de la célula huésped transformada con tales composiciones de polinucleótido en un medio de cultivo adecuado; y

(b) purificar la proteína del cultivo.

La presente invención también proporciona la proteína producida según tales procedimientos.

Las composiciones de proteína descritas en el presente documento pueden comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden un anticuerpo que reacciona específicamente con tal proteína se describen también en el presente documento.

Se describen también procedimientos para evitar, tratar o mejorar una afección médica que comprenden administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una proteína de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada

Proteínas y polinucleótidos aislados

A continuación se notifican secuencias de nucleótidos y aminoácidos, tal como se determinan en el presente documento, para cada clon y proteína dada a continuación. La secuencia de nucleótidos de cada clon puede determinarse fácilmente secuenciando el clon depositado según procedimientos conocidos. Entonces puede

determinarse la secuencia de aminoácidos prevista (formas tanto de longitud completa como madura) a partir de tal secuencia de nucleótidos. También puede determinarse la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por un clon particular mediante expresión del clon en una célula huésped adecuada, recogida de la proteína y determinación de su secuencia.

- 5 Tal como se usa en el presente documento una proteína "secretada" es una que, cuando se expresa en una célula huésped adecuada, se transporta a través de una membrana, incluyendo transporte como resultado de secuencias señal en su secuencia de aminoácidos. Las proteínas "secretadas" incluyen, sin limitación, proteínas secretadas totalmente (por ejemplo, proteínas solubles) o parcialmente (por ejemplo, receptores) de la célula en la que se expresan. Las proteínas "secretadas" también incluyen, sin limitación, proteínas que se transportan a través de la
- 10 membrana del retículo endoplasmático.

Clon "hGIL-19/AE289"

- Se identificó inicialmente un polinucleótido de la presente invención como clon "hTIF/AE289", posteriormente se renombró y también se le hace referencia en el presente documento como "hGIL-19/AE289" y "hGIL-19". El clon hGIL-19/AE289 se aisló según el siguiente procedimiento. Se identificó una EST murina a partir de una biblioteca de
- 15 ADNc murino preparada a partir de esplenocitos activados tanto con ConA como células dendríticas derivadas de médula ósea. Se identificó la EST usando procedimientos que son selectivos para ADNc que codifican proteínas secretadas (véase la patente estadounidense número 5.536.637). Se usó la secuencia EST murina para aislar un clon murino de longitud completa de la misma biblioteca de ADNc (SEC ID N.º: 4; la figura 1 representa la secuencia del ADNc de GIL-19 murino). El análisis de la secuencia del clon murino reveló una homología significativa con
- 20 interleucina-10 (IL-10).

- Con el fin de aislar un homólogo humano del clon murino, se construyeron cebadores de PCR basándose en la región de la secuencia murina que mostraba homología con IL-10. El uso de tales cebadores para la amplificación en una biblioteca de CMSP humanas produjo un producto de PCR de tamaño significativo. El análisis de la
- 25 secuencia del producto de PCR confirmó que era un homólogo del ADNc murino. Se construyeron oligonucleótidos a partir de la secuencia del clon humano parcial y se usaron para aislar un clon de longitud completa humano de la biblioteca de CMSP.

El hGIL-19/AE289 es un clon humano de longitud completa, que incluye toda la secuencia codificante de una proteína secretada (también denominada en el presente documento como "proteína de hTIF/AE289", "proteína de hGIL-19/AE289" y "proteína de hGIL-19"). El análisis de su secuencia confirma su homología con IL-10.

- 30 La secuencia de nucleótidos de hGIL-19 tal como se determina en el presente documento se notifica en SEC ID N.º: 1 e incluye un cola de poli(A). El marco de lectura abierto y la secuencia de aminoácidos de proteína hGIL-19 de longitud completa correspondiente a la secuencia de nucleótidos anterior se notifica en SEC ID N.º: 2. La secuencia de aminoácidos de hGIL-19 madura corresponde a los aminoácidos 34-179 de SEC ID N.º: 2.

- El clon "hGIL-19/AE289" se depositó el 28 de abril de 1999 en la colección americana de cultivos tipo ("American Type Culture Collection") (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 EE.UU.) como un depósito original según el tratado de Budapest y se le asignó el número de acceso ATCC 207231. Todas las limitaciones sobre la disponibilidad para el público del material depositado se eliminarán irrevocablemente tras conceder la
- 35 patente, salvo por los requisitos especificados en el artículo 37 del C.F.R. n.º 1.808(b) y el término del depósito cumplirá con el artículo 37 del C.F.R. n.º 1.806.

- 40 La presente invención también abarca fragmentos de las proteínas de la presente invención (por ejemplo fragmentos que pueden mostrar actividad biológica). Los fragmentos de la proteína pueden ser de forma lineal o pueden ciclarse usando procedimientos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en H. U. Saragovi, *et al.*, *Bio/Technology* 10, 773-778 (1992) y en R. S. McDowell, *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114, 9245-9253 (1992). Tales fragmentos pueden fusionarse con moléculas vehículo tales como inmunoglobulinas para muchos fines, incluyendo aumentar la valencia de los sitios de unión a proteína. Por ejemplo, los fragmentos de la proteína pueden fusionarse a través de
- 45 secuencias "conectoras" a la parte Fc de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la proteína, una fusión de este tipo puede ser a la parte Fc de una molécula de IgG. También pueden usarse otros isotipos de inmunoglobulina para generar tales fusiones. Por ejemplo, una fusión proteína-IgM generará una forma decavalente de la proteína de la invención.

- 50 La presente invención también proporciona las formas tanto de longitud completa como madura de las proteínas descritas. La forma de longitud completa de tales proteínas se identifica en el listado de secuencias mediante traducción de la secuencia de nucleótidos de cada clon descrito. La(s) forma(s) madura(s) de tal proteína puede(n) obtenerse mediante expresión del polinucleótido de longitud completa descrito (preferiblemente los depositados en la ATCC) en una célula de mamífero adecuada u otra célula huésped. La(s) secuencia(s) de la(s) forma(s)
- 55 madura(s) de la proteína también pueden ser determinables a partir de la secuencia de aminoácidos de la forma de longitud completa y se exponen en el presente documento, por ejemplo como aminoácidos 1-179 de SEC ID N.º: 2.

La presente invención también proporciona genes correspondientes a las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento. Los "genes correspondientes" son las regiones del genoma que se transcriben para producir

los ARNm a partir de los que se derivan las secuencias de polinucleótido de ADNc y pueden incluir regiones contiguas del genoma necesarias para la expresión regulada de tales genes. Los genes correspondientes pueden incluir por tanto, pero no se limitan a, secuencias codificantes, regiones no traducidas en sentido 5' y 3', potenciadores, promotores, intrones y exones cortados de manera alternativa y elementos silenciadores o supresores. Los genes correspondientes pueden aislarse según procedimientos conocidos usando la información de secuencia descrita en el presente documento. Tales procedimientos incluyen la preparación de sondas o cebadores a partir de la información de secuencia descrita para la identificación y/o amplificación de genes en bibliotecas genómicas apropiadas u otras fuentes de materiales genómicos. Un "gen aislado" es un gen que se ha separado de las secuencias codificantes adyacentes, si las hay, presentes en el genoma del organismo del que se ha aislado el gen.

También puede determinarse la ubicación cromosómica correspondiente a las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento, por ejemplo, hibridando polinucleótidos de la presente invención apropiadamente marcados con cromosomas *in situ*. También puede ser posible determinar la ubicación cromosómica correspondiente para un polinucleótido descrito identificando secuencias de nucleótidos significativamente similares en bases de datos públicas, tales como etiquetas de secuencia expresadas (EST), que ya se han mapeado en ubicaciones cromosómicas particulares. Para al menos algunas de las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento, se han enumerado secuencias de bases de datos públicas que tienen al menos algo de similitud con el polinucleótido de la presente invención mediante número de acceso de la base de datos. Entonces pueden realizarse búsquedas usando los números de acceso de GeneBank de estas secuencias de bases de datos públicas en un sitio de internet proporcionado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica ("National Center for Biotechnology Information") que tiene la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>, con el fin de identificar "agrupaciones de UniGene" de secuencias solapantes. Muchas de las "agrupaciones de UniGene" así identificadas ya se habrán mapeado en sitios cromosómicos particulares.

Se proporcionan organismos que tienen expresión potenciada, reducida o modificada del/de los gen(es) correspondientes a las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento. El cambio deseado en la expresión génica puede lograrse mediante el uso de polinucleótidos antisentido o ribozimas que se unen y/o rompen el ARNm transcrito a partir del gen (Albert y Morris, 1994, Trends Pharmacol. Sci. 15(7): 250-254; Lavarosky *et al.*, 1997, Biochem. Mol. Med 62(1): 11-22; y Hampel, 1998, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 58: 1-39). Se proporcionan animales transgénicos no humanos que tienen múltiples copias del/de los gen(es) correspondiente(s) a las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento, preferiblemente producidos mediante transformación de células con construcciones génicas que se mantienen de manera estable dentro de las células transformadas y su progenie. También se proporcionan animales transgénicos no humanos que tienen regiones de control génico modificadas que aumentan o reducen los niveles de expresión génica, o que cambian los patrones temporales o espaciales de la expresión génica (véase la patente europea número 0649 464 B1). Además, se proporcionan organismos no humanos en los que el/los gen(es) correspondiente(s) a las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento se han inactivado parcial o completamente, mediante inserción de secuencias extrañas en el/los gen(es) correspondiente(s) o mediante delección de todos o parte del/de los gen(es) correspondiente(s). La inactivación génica parcial o completa puede lograrse mediante inserción, preferiblemente seguido por escisión imprecisa, de elementos transponibles (Plasterk, 1992, Bioessays 14(9): 629-633; Zwaal *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(16): 7431-7435; Clark *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(2): 719-722), o mediante recombinación homóloga, preferiblemente detectada mediante estrategias de selección génica positiva/negativa (Mansour *et al.*, 1988, Nature 336: 348-352; patentes estadounidenses números 5.464.764; 5.487.992; 5.627.059; 5.631.153; 5.614.396; 5.616.491 y 5.679.523). Estos organismos con expresión génica alterada son preferiblemente eucariotas y son más preferiblemente mamíferos no humanos. Tales organismos son útiles para el desarrollo de modelos no humanos para el estudio de trastornos que implican el/los gen(es) correspondiente(s) y para el desarrollo de sistemas de ensayo para la identificación de moléculas que interactúan con el/los producto(s) de proteína del/de los gen(es) correspondiente(s).

Los dominios de proteínas intracelulares y transmembrana de la invención se pueden identificar de acuerdo con técnicas conocidas para la determinación de tales dominios a partir de la información de secuencia. Por ejemplo, el programa de ordenador TopPredIII se puede usar para predecir la localización de dominios transmembrana en una secuencia de aminoácidos, dominios que se describen por la localización del centro del dominio transmembrana, con al menos diez aminoácidos transmembrana en cada lado del/de los residuo(s) central(es) comunicado(s).

Las proteínas y fragmentos de proteína incluyen proteínas con longitudes de secuencia de aminoácidos que son al menos el 25% (más preferiblemente al menos el 50% y lo más preferiblemente al menos el 75%) de la longitud de una proteína descrita y tienen al menos el 60% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 75% de identidad; lo más preferiblemente al menos el 90% o el 95% de identidad) con esa proteína descrita, en las que la identidad de secuencia se determina comparando las secuencias de aminoácidos de las proteínas cuando están alineadas de manera que se maximiza el solapamiento y la identidad al tiempo que se minimizan los huecos de secuencia. También se describen en el presente documento proteínas y fragmentos de proteína que contienen un segmento que comprende preferiblemente 8 o más (más preferiblemente 20 o más, lo más preferiblemente 30 o más) aminoácidos contiguos que comparte al menos el 75% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 85% de identidad; lo más preferiblemente al menos el 95% de identidad) con cualquier segmento de este

tipo de cualquiera de las proteínas descritas.

En una realización, las proteínas, fragmentos de proteína y proteínas recombinantes de la presente invención incluyen las que pueden identificarse basándose en la presencia de al menos un "motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289." Tal como se usa en el presente documento, la expresión "motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289" incluye secuencias o residuos de aminoácidos que son importantes para la unión de hGIL-19 a su receptor requerido. También se describe en el presente documento una proteína hGIL-19 que contiene un motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289 que incluye aproximadamente los aminoácidos 50-60 de SEC ID N.º: 2. También se describe en el presente documento una proteína GIL-19 que contiene un motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289 que incluye aproximadamente los aminoácidos 63-81 de SEC ID N.º: 2. También se describe en el presente documento una proteína GIL-19 que contiene un motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289 que incluye aproximadamente los aminoácidos 168-177 de SEC ID N.º: 2. También se describe en el presente documento una proteína GIL-19 que contiene un motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289 que incluye al menos uno de los aminoácidos 50-60, los aminoácidos 63-81 y/o aproximadamente los aminoácidos 168-177 de SEC ID N.º: 2.

También se describe en el presente documento un motivo de unión al receptor de hGIL-19/AE289 que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad o más con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 50-60 de SEC ID N.º: 2, los aminoácidos 63-81 de SEC ID N.º: 2 y los aminoácidos 168-177 de SEC ID N.º: 2.

En otra realización, las proteínas, fragmentos de proteína y proteínas recombinantes de la presente invención incluyen aquellas que pueden identificarse basándose en la presencia de al menos uno, dos, tres, cuatro o más sitios para la glucosilación unida a N.

En particular, la identidad de secuencia puede determinarse usando el programa WU-BLAST (Washington University BLAST) versión 2.0, que se construye basándose en WU-BLAST versión 1.4, que a su vez se basa en el NCBI-BLAST de dominio público versión 1.4 (Altschul y Gish, 1996, Local alignment statistics, Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul *et al.*, 1990, Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology 215: 403-410; Gish y States, 1993, Identification of protein coding regions by database similarity search, Nature Genetics 3: 266-272; Karlin y Altschul, 1993, Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877). Los programas ejecutables de WU-BLAST versión 2.0 para diversas plataformas UNIX pueden descargarse desde <ftp://blast.wustl.edu/bast/executables>. En ese sitio se proporciona la serie completa de programas de búsqueda (BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX), además de varios programas de apoyo. WU-BLAST 2.0 está registrado y no puede venderse ni redistribuirse de ninguna forma ni manera sin el consentimiento expreso por escrito del autor; pero por lo demás los ejecutables publicados pueden usarse libremente para fines comerciales, sin beneficio o académicos. En todos los programas de búsqueda en la serie (BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX) las rutinas de alineación con huecos son parte integral de la propia búsqueda de bases de datos y por tanto proporcionan una sensibilidad y selectividad mucho mejores mientras producen un resultado más fácilmente interpretable. Opcionalmente, puede desactivarse la formación de huecos en todos estos programas, si se desea. La penalización por defecto (Q) para un hueco de longitud uno es Q=9 para proteínas y BLASTP y Q=10 para BLASTN, pero puede cambiarse por cualquier valor entero incluyendo cero, de uno a ocho, nueve, diez, once, de doce a veinte, de veintiuno a cincuenta, de cincuenta y uno a cien, etc. La penalización por residuo por defecto para extender un hueco (R) es R=2 para proteínas y BLASTP y R=10 para BLASTN, pero puede cambiarse por cualquier valor entero incluyendo cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, de doce a veinte, de veintiuno a cincuenta, de cincuenta y uno a cien, etc. Puede usarse cualquier combinación de valores para Q y R con el fin de alinear secuencias de manera que se maximice el solapamiento e identidad mientras que se minimizan los huecos de secuencia. La matriz de comparación de aminoácidos por defecto es BLOSUM62, pero pueden utilizarse otras matrices de comparación de aminoácidos tales como PAM.

En el presente documento también se describen homólogos de especie de los polinucleótidos y proteínas dados a conocer. Tal como se usa en el presente documento, un "homólogo de especie" es una proteína o polinucleótido con una especie de origen diferente de la de una proteína o polinucleótido dado, pero con similitud de secuencia significativa con la proteína o polinucleótido dado. Preferiblemente, los homólogos de especie de polinucleótidos tienen al menos el 60% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) con el polinucleótido dado y los homólogos de especie de proteína tienen al menos el 30% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%) con la proteína dada, en los que la identidad de secuencia se determina comparando las secuencias de nucleótidos de los polinucleótidos o la secuencias de aminoácidos de las proteínas cuando están alineadas de manera que se maximiza el solapamiento y la identidad mientras se minimizan los huecos de secuencia. Los homólogos de especie pueden aislarse e identificarse preparando sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en el presente documento y examinando una fuente de ácido nucleico adecuada a partir de la especie deseada. Preferiblemente, los homólogos de especie son los aislados a partir de especies de mamíferos. Lo más preferiblemente, los homólogos de especie son los aislados a partir de ciertas especies de mamíferos tales como, por ejemplo, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Hylobates concolor*, *Macaca mulatta*, *Papio papio*, *Papio hamadryas*, *Cercopithecus aethiops*, *Cebus capucinus*, *Aotus trivirgatus*, *Sanguinus oedipus*,

5 *Microcebus murinus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus*, *Felis catus*, *Mustela vison*, *Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa* y *Equus caballus*, para los que se han creado mapas genéticos que permiten la identificación de relaciones sinténicas entre la organización genómica de genes en una especie y la organización genómica de los genes relacionados en otra especie (O'Brien y Seuánez, 1988, Ann. Rev. Genet. 22: 323-351; O'Brien *et al.*, 1993, Nature Genetics 3: 103-112; Johansson *et al.*, 1995, Genomics 25: 682-690; Lyons *et al.*, 1997, Nature Genetics 15: 47-56; O'Brien *et al.*, 1997, Trends in Genetics 13(10): 393-399; Carver y Stubbs, 1997, Genome Research 7: 1123-1137).

10 En el presente documento también se describen variantes alélicas de los polinucleótidos o proteínas descritas; es decir, formas alternativas que se producen de manera natural de los polinucleótidos aislados que también codifican proteínas que son idénticas o tienen secuencias significativamente similares a las codificadas por los polinucleótidos descritos. Las variantes alélicas pueden tener al menos el 60% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) con el polinucleótido dado, en el que la identidad de secuencia se determina comparando las secuencias de nucleótidos de los polinucleótidos cuando están alineadas de manera que se maximiza el solapamiento y la identidad mientras se minimizan los huecos de secuencia. Las variantes alélicas
15 pueden aislarse e identificarse preparando sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en el presente documento y examinando una fuente de ácido nucleico adecuada a partir de individuos de la especie apropiada.

La invención también incluye polinucleótidos con secuencias complementarias a las de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

20 También se describen en el presente documento polinucleótidos que se hibridan en condiciones sumamente rigurosas con polinucleótidos descritos en el presente documento. En el presente documento también se describen polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas o de rigurosidad reducida con polinucleótidos descritos en el presente documento. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad se muestran en la tabla siguiente: las condiciones sumamente rigurosas son las que son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones A-F; las condiciones rigurosas son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones G-L; y las condiciones de rigurosidad reducida son al menos tan rigurosas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

Condición de rigurosidad	Híbrido de polinucleótido	Longitud del híbrido (pb) [‡]	Tampón y temperatura de hibridación [†]	Tampón y temperatura de lavado [†]
A	ADN:ADN	≥50	65°C; 1xSSC o 42°C; 1xSSC, formamida al 50%	65°C; 0,3xSSC
B	ADN:ADN	<50	T _B *; 1xSSC	T _B *; 1SSC
C	ADN:ARN	≥50	67°C; 1xSSC o 45°C; 1xSSC, formamida al 50%	67°C; 0,3SSC
D	ADN:ARN	<50	T _D *; 1xSSC	T _D *; 1SSC
E	ARN:ARN	≥50	70°C; 1xSSC o 50°C; 1xSSC, formamida al 50%	70°C; 0,3xSSC
F	ARN:ARN	<50	T _F *; 1xSSC	T _F *; 1xSSC
G	ADN:ADN	≥50	65°C; 4xSSC o 42°C; 4xSSC, formamida al 50%	65°C; 1xSSC
H	ADN:ADN	<50	T _H *; 4xSSC	T _H *; 4xSSC
I	ADN:ARN	≥50	67°C; 4xSSC o 45°C; 4xSSC, formamida al 50%	67°C; 1xSSC
J	ADN:ARN	<50	T _J *; 4xSSC	T _J *; 4xSSC
K	ARN:ARN	≥50	70°C; 4xSSC o 50°C; 4xSSC, formamida al 50%	67°C; 1xSSC
L	ARN:ARN	<50	T _L *; 2xSSC	T _L *; 2xSSC
M	ADN:ADN	≥50	50°C; 4xSSC o 40°C;	50°C; 2xSSC

			6xSSC, formamida al 50%	
N	ADN:ADN	<50	T _N *; 6xSSC	T _N *; 6xSSC
O	ADN:ARN	≥50	55°C; 4xSSC o 42°C; 6xSSC, formamida al 50%	55°C; 2xSSC
P	ADN:ARN	<50	T _P *; 6xSSC	T _P *; 6xSSC
Q	ARN:ARN	≥50	60°C; 4xSSC o 45°C; 6xSSC, formamida al 50%	60°C; 2xSSC

(continuación)

Condición de rigurosidad	Híbrido de polinucleótido	Longitud del híbrido (pb) [‡]	Tampón y temperatura de hibridación [†]	Tampón y temperatura de lavado [†]
R	ARN:ARN	<50	T _R *; 4SSC	T _R *; 4SSC

[‡]: La longitud del híbrido es la anticipada para la(s) región/regiones hibridada(s) de los polinucleótidos de hibridación. Cuando se hibrida un polinucleótido con un polinucleótido diana de secuencia desconocida, se supone que la longitud del híbrido es la del polinucleótido de hibridación. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencias conocidas, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad óptima de secuencias.

[†]: SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; se realizan lavados durante 15 minutos tras completar la hibridación.

^{*}T_B - T_R: la temperatura de hibridación para híbridos que se anticipa que tienen menos de 50 pares de bases de longitud debe ser 5-10°C inferior a la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, en la que la T_m se determina según las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_m(°C) = 2(n° de bases A + T) + 4(n° de bases G + C). Para híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_m(°C) = 81,5 + 16,6(log₁₀[Na⁺]) + 0,41(% de G+C) - (600/N), en la que N es el número de bases en el híbrido y [Na⁺] es la concentración de iones sodio en el tampón de hibridación ([Na⁺] para 1xSSC = 0,165 M).

En Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 y 11 y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4, se proporcionan ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para la hibridación de polinucleótidos.

- 5 Preferiblemente, cada uno de tales polinucleótidos de hibridación tiene una longitud que es al menos el 25% (más preferiblemente al menos el 50% y lo más preferiblemente al menos el 75%) de la longitud del polinucleótido de la presente invención con el que se hibrida y tiene al menos el 60% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos el 75% de identidad; lo más preferiblemente al menos el 90% o el 95% de identidad) con el polinucleótido de la presente invención con el que se hibrida, en el que la identidad de secuencia se determina comparando las
- 10 secuencias de los polinucleótidos de hibridación de manera que se maximiza el solapamiento y la identidad mientras se minimizan los huecos de secuencia.

15 El polinucleótido aislado de la invención puede estar operativamente unido a una secuencia de control de la expresión tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991), con el fin de producir la proteína de manera recombinante. En la técnica se conocen muchas secuencias de control de la expresión. También se conocen procedimientos generales de expresión de proteínas recombinantes y se ejemplifican en R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185,537-566 (1990). Según se define en el presente documento, "operativamente unido" significa que el polinucleótido aislado de la invención y una secuencia de control de la expresión están situados dentro de un vector o célula de tal manera que se expresa la proteína mediante una célula huésped que se ha transformado (transfectado) con el polinucleótido acoplado/secuencia de

20 control de la expresión.

Varios tipos de células pueden actuar como células huésped para la expresión de la proteína. Las células huésped de mamíferos incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón humano, células A431 epidérmicas humanas, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario, explantos primarios, células HeLa, células L de ratón, BHK, HL-60, U937, HaK o células Jurkat.

25

Como alternativa, puede ser posible producir la proteína en eucariotas inferiores tales como levaduras o en

procariotas tales como bacterias. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura que pueda expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cualquier cepa bacteriana que pueda expresar proteínas heterólogas. Si la proteína se fabrica en levaduras o bacterias, puede ser necesario modificar la proteína producida en las mismas, por ejemplo mediante fosforilación o glucosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener la proteína funcional. Tales uniones covalentes pueden lograrse usando procedimientos químicos o enzimáticos conocidos.

La proteína también puede producirse uniendo de manera operativa el polinucleótido aislado de la invención con secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos y empleando un sistema de expresión en insectos. Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión en baculovirus/células de insectos están disponibles comercialmente en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, California, EE.UU. (el kit MaxBac®) y tales procedimientos se conocen bien en la técnica, tal como se describe en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin n° 1555 (1987). Tal como se usa en el presente documento, una célula de insecto que puede expresar un polinucleótido de la presente invención está "transformada".

La proteína de la invención puede prepararse cultivando células huésped transformadas en condiciones de cultivo adecuadas para expresar la proteína recombinante. Entonces puede purificarse la proteína expresada resultante a partir de un cultivo de este tipo (es decir, a partir de medio de cultivo o extractos celulares) usando procedimientos de purificación conocidos, tales como cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. La purificación de la proteína también puede incluir una columna de afinidad que contiene agentes que se unirán a la proteína; una o más etapas de columna sobre resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, heparina-toyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; una o más etapas que implican cromatografía de interacción hidrófoba usando resinas tales como fenil éter, butil éter o propil éter; o cromatografía de inmovilización.

Como alternativa, la proteína de la invención también puede expresarse en una forma que facilitará la purificación. Por ejemplo, puede expresarse como una proteína de fusión, tal como las de proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o tiorredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de tales proteínas de fusión están disponibles comercialmente de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA), respectivamente. La proteína también puede marcarse con etiquetas con un epítipo y posteriormente purificarse usando un anticuerpo específico dirigido contra tal epítipo. Un epítipo de este tipo ("Flag") está disponible comercialmente de Eastman Kodak Company (New Haven, CT).

Además, para purificar adicionalmente la proteína, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófoba, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente homogénea. La proteína así purificada está sustancialmente libre de otras proteínas de mamíferos y se define según la presente invención como una "proteína aislada".

La proteína de la invención también puede expresarse como un producto de animales transgénicos no humanos, por ejemplo, como componente de la leche de vacas, cabras, cerdos u ovejas transgénicas que se caracterizan por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína.

La proteína también puede producirse mediante síntesis química convencional conocida. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para construir las proteínas de la presente invención por medios sintéticos. Las secuencias de proteína construida de manera sintética, en virtud de que comparten características de estructura primaria, secundaria o terciaria y/o conformacionales con proteínas, pueden poseer propiedades biológicas en común con las mismas, incluyendo actividad de proteína. Por tanto, pueden emplearse como sustitutos inmunológicos o biológicamente activos para proteínas naturales, purificadas en la selección de compuestos terapéuticos y en procedimientos inmunológicos para el desarrollo de anticuerpos.

Las proteínas proporcionadas en el presente documento también incluyen proteínas caracterizadas por secuencias de aminoácidos similares a las de proteínas purificadas pero en las que se proporcionan modificaciones de manera natural o se diseñan deliberadamente mediante ingeniería. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden preparar modificaciones en el péptido o secuencias de ADN usando técnicas conocidas. Las modificaciones de interés en las secuencias de proteína pueden incluir la alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección de un residuo de aminoácido seleccionado en la secuencia codificante. Por ejemplo, uno o más de los residuos de cisteína pueden deleccionarse o reemplazarse por otro aminoácido para alterar la conformación de la molécula. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas para tal alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 4.518.584). Preferiblemente, tal alteración, sustitución, reemplazo, inserción o delección conserva la actividad deseada de la proteína.

Otros fragmentos y derivados de las secuencias de proteínas que se espera que conserven actividad de proteína en su totalidad o en parte y por tanto pueden ser útiles para la selección u otras metodologías inmunológicas también pueden prepararse fácilmente por los expertos en la técnica teniendo en cuenta las descripciones en el presente documento. Se cree que tales modificaciones están abarcadas por la presente invención.

Usos y actividad biológica

Los polinucleótidos y proteínas de la presente invención pueden mostrar uno o más de los usos o actividades biológicas (incluyendo las asociadas con ensayos mencionados en el presente documento) identificadas a continuación. Los usos o actividades descritas para proteínas de la presente invención puede proporcionarse mediante administración o uso de tales proteínas o mediante administración o uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores adecuados para la introducción ADN).

Usos de hGIL-19

Debido a su homología con IL-10, la GIL-19/AE289 humana puede considerarse un miembro de la familia general de las citocinas y como tal, puede mostrar actividades similares a IL-10. Las citocinas desempeñan papeles importantes en la salud y la enfermedad y tienen múltiples indicaciones clínicas. Por tanto, esta molécula (y otras moléculas de la presente invención) serán útiles como agonista en ciertas indicaciones clínicas y los antagonistas de esta molécula serán útiles en otras situaciones clínicas, particularmente en aquellas en las que IL-10 actúa como agonista o los antagonistas de IL-10 actúan como un antagonista. Si el fármaco preferido es el agonista o el antagonista dependerá de los aspectos particulares de la patología de la enfermedad, tales como los tipos celulares implicados, la naturaleza del estímulo y el microentorno celular.

En una realización preferida, una actividad de hGIL-19 es al menos una o más de las siguientes actividades: (1) modulación, por ejemplo antagonizar una ruta de transducción de señales (por ejemplo una ruta dependiente de GIL-19); (2) modulación de la producción y/o secreción de citocinas (por ejemplo, producción y/o secreción de una citocina proinflamatoria); (3) modulación de la producción y/o secreción de linfocinas; (4) modulación de la producción de moléculas de adhesión y/o adhesión celular; (5) modulación de la expresión o actividad de factores de transcripción nucleares; (7) modulación de la secreción de IL-1; (8) competencia con receptores para otras citocinas; (9) competencia con otra proteína miembro de la familia de hGIL-19 para unirse al receptor de hGIL-19; (10) modulación de la translocación nuclear de receptor internalizado para hGIL-19 u otra citocina o receptor complejado con ligando, (11) modulación de la proliferación, desarrollo o diferenciación celular, por ejemplo, proliferación, desarrollo o diferenciación estimulada por proteína hGIL-19 o estimulada por citocina (por ejemplo, de una célula epitelial, por ejemplo, una célula epitelial escamosa del esófago, o de una célula de la piel, por ejemplo, un queratinocito); (12) modulación de la proliferación, desarrollo o diferenciación celular de una célula osteógena (por ejemplo, de una célula precursora de osteoclastos, osteoclasto y/u osteoblasto); (13) modulación de la formación ósea, metabolismo óseo y/u homeostasis ósea (por ejemplo, inhibición de la resorción ósea); (15) modulación de respuestas inmunitarias celulares; (16) modulación de acciones proinflamatorias mediadas por citocinas (por ejemplo, inhibición de la síntesis de proteína de fase aguda por hepatocitos, fiebre y/o síntesis de prostaglandina, por ejemplo síntesis de PGE₂); y (17) promoción y/o potenciación de la cicatrización de heridas.

Teniendo en cuenta su aparente papel inmunomodulador, las proteínas GIL-19/AE289 humanas pueden actuar sobre los siguientes tipos celulares: células T, células B, células dendríticas, macrófagos/monocitos, neutrófilos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células presentadoras de antígenos del sistema nervioso y células presentadoras de antígenos del riñón. Basándose en su homología con IL-10, las proteínas GIL-19/AE289 humanas (o agonistas o antagonistas de las mismas) pueden tener las siguientes actividades y usos:

- (a) regulación por incremento de respuestas inmunitarias humorales y atenúa las reacciones inmunitarias mediadas por células;
- (b) función como agente antiinflamatorio mediante inhibición de la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias;
- (c) modulación de respuestas inflamatorias asociadas con lesión, septicemia, enfermedad gastrointestinal y cardiovascular e inflamación tras la cirugía;
- (d) tratamiento de leucemia mielógena aguda, linfoma no de Hodgkin, trasplante de médula ósea para tratar al receptor antes de un injerto, trasplante de médula ósea para tratar las células madre del donante antes del trasplante y para mejorar la enfermedad de injerto contra huésped tras un trasplante de médula ósea;
- (e) tratamiento de enfermedades autoinmunitarias mediadas por células tales como esclerosis múltiple, diabetes, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, nefrotoxicidad asociada con glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, pancreatitis y asma.

Los agonistas de GIL-19/AE289 humana incluyen, sin limitación, proteínas GIL-19/AE289 humanas y fragmentos, mutantes de delección y mutantes de adición de las mismas; y péptido y compuestos de molécula pequeña que interactúan con el receptor u otra diana a la que se dirige la GIL-19/AE289 humana. Los antagonistas de GIL-19/AE289 humana incluyen, sin limitación, anticuerpos dirigidos contra proteínas GIL-19/AE289 humanas; formas solubles del receptor u otra diana a la que se dirige la GIL-19/AE289 humana; anticuerpos dirigidos contra el receptor u otra diana a la que se dirige la GIL-19/AE289 humana; y péptido y compuestos de molécula pequeña que inhiben o interfieren con la interacción de GIL-19/AE289 humana con su receptor u otra diana.

Utilidades y usos de investigación

Los polinucleótidos proporcionados por la presente invención pueden usarse por la comunidad de investigación para diversos fines. Los polinucleótidos pueden usarse para expresar proteína recombinante para análisis, caracterización o uso terapéutico; como marcadores para tejidos en los que se expresa preferiblemente la proteína correspondiente (ya sea constitutivamente o en una fase particular de diferenciación o desarrollo tisular o en estados patológicos); como marcadores de peso molecular sobre geles de tipo Southern; como etiquetas o marcadores de cromosomas (cuando están marcados) para identificar cromosomas o para mapear posiciones de genes relacionados; para compararse con secuencias de ADN endógenas en pacientes para identificar posibles trastornos genéticos; como sondas para hibridarse y así descubrir secuencias de ADN novedosas, relacionadas; como fuente de información para derivar cebadores de PCR para la huella genética; como una sonda para "extraer por sustracción" secuencias conocidas en el procedimiento para descubrir otros polinucleótidos novedosos; para seleccionar y preparar oligómeros para la unión a una "micromatriz génica" u otro soporte, incluyendo para la exploración de patrones de expresión; para preparar anticuerpos anti-proteína usando técnicas de inmunización de ADN; y como antígeno para preparar anticuerpos anti-ADN o provocar otra respuesta inmunitaria. Cuando el polinucleótido codifica una proteína que se une o potencialmente se une a otra proteína (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), el polinucleótido también puede usarse en ensayos de trampa de interacción (tales como, por ejemplo, los descritos en Gyuris *et al.*, 1993, Cell 75: 791-803 y en Rossi *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8405-8410) para identificar polinucleótidos que codifican la otra proteína con la que se produce la unión o para identificar inhibidores de la interacción de unión.

Las proteínas proporcionadas por la presente invención pueden usarse de manera similar en ensayos para determinar la actividad biológica, incluyendo en un panel de múltiples proteínas para la selección de alto rendimiento; para preparar anticuerpos o para provocar otra respuesta inmunitaria; como reactivo (incluyendo el reactivo marcado) en ensayos diseñados para determinar cuantitativamente los niveles de la proteína (o su receptor) en fluidos biológicos; como marcadores para tejidos en los que se expresa preferiblemente la proteína correspondiente (ya sea constitutivamente o en una fase particular de la diferenciación o desarrollo tisular o en un estado patológico); y por supuesto, para aislar ligandos o receptores correlativos. Cuando la proteína se une o posiblemente se une a otra proteína (tal como, por ejemplo, en una interacción receptor-ligando), la proteína puede usarse para identificar la otra proteína con la que se produce la unión o para identificar inhibidores de la interacción de unión. Las proteínas implicadas en estas interacciones de unión también pueden usarse para examinar para seleccionar inhibidores peptídicos o de molécula pequeña o agonistas de la interacción de unión.

Cualquiera o todas estas utilidades de investigación pueden desarrollarse en un formato de kit o calidad de reactivo para su comercialización como productos de investigación.

Los procedimientos para realizar los usos enumerados anteriormente se conocen bien por los expertos en la técnica. Las referencias que describen tales procedimientos incluyen, sin limitación, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis eds., 1989 y "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Berger, S. L. y A. R. Kimmel eds., 1987.

Usos nutricionales

Los polinucleótidos y proteínas de la presente invención también pueden usarse como fuentes o complementos nutricionales. Tales usos incluyen, sin limitación, el uso como un complemento de proteínas o aminoácidos, uso como una fuente de carbono, uso como una fuente de nitrógeno y uso como una fuente de hidratos de carbono. En tales casos, la proteína o polinucleótido de la invención puede añadirse a la alimentación de un organismo particular o puede administrarse como una preparación sólida o líquida separada, tal como en forma de polvos, pastillas, disoluciones, suspensiones o cápsulas. En el caso de microorganismos, la proteína o polinucleótido de la invención puede añadirse al medio en o sobre el que se cultiva el microorganismo.

Actividad de citocinas y de diferenciación/proliferación celular

Una proteína de la presente invención puede mostrar actividad de citocinas, de proliferación celular (induciendo o bien inhibiendo) o de diferenciación celular (induciendo o bien inhibiendo) o puede inducir la producción de otras citocinas en determinadas poblaciones celulares. Muchos factores proteicos descubiertos hasta la fecha, incluyendo todas las citocinas conocidas, han mostrado actividad en uno o más ensayos de proliferación celular dependiente de factor y por tanto los ensayos sirven como una confirmación conveniente de la actividad de citocinas. La actividad de una proteína de la presente invención se pone en evidencia mediante uno cualquiera de varios ensayos rutinarios de proliferación celular dependiente de factor para líneas celulares incluyendo, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preBM+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK. La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos para determinar la proliferación de células T o timocitos incluyen sin limitación los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed por J. E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-

3.19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 145: 1706-1712, 1990; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, *et al.*, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992; Bowman *et al.*, J. Immunol. 152: 1756-1761, 1994.

5 Los ensayos para determinar la producción de citocinas y/o proliferación de células del bazo, células de los ganglios linfáticos o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A.M. y Shevach, E.M. en Current Protocols in Immunology. J.E. Coligan eds. volumen 1 págs. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; y Measurement of mouse and human Interferon γ , Schreiber, R.D. en Current Protocols in Immunology. J.E. Coligan eds. volumen 1 págs. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

10 Los ensayos para determinar la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, los descritos en: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L.S. y Lipsky, P.E. en Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. volumen 1 págs. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries *et al.*, J. Exp. Med. 173: 1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, Nature 336: 690-692, 1988; Greenberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6 - Nördan, R. en Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. volumen I págs. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 1857-1861, 1986; Measurement of human Interleukin 11 - Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S.C. y Turner, K. J. en Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. volumen 1 págs. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9 - Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S.C. y Turner, K.J. en Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. volumen 1 págs. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

20 Los ensayos para determinar respuestas de clones de células T frente a antígenos (que identificarán, entre otras, proteínas que afectan a las interacciones APC-células T así como los efectos directos de células T midiendo la proliferación y producción de citocinas) incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function; capítulo 6, Cytokines and their cellular receptors; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, Eur. J. Immun. 11: 405-411, 1981; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

Actividad inmunoestimulante o inmunosupresora

30 Una proteína de la presente invención también puede mostrar actividad inmunoestimulante o inmunosupresora, incluyendo sin limitación las actividades para las que se describen ensayos en el presente documento. Una proteína puede ser útil en el tratamiento de diversas deficiencias y trastornos inmunitarios (incluyendo inmunodeficiencia combinada grave (SCID)), por ejemplo, en la regulación (por incremento o disminución) del crecimiento y proliferación de linfocitos T y/o B, así como afectando a la actividad citolítica de células NK y otras poblaciones celulares. Estas inmunodeficiencias pueden ser genéticas o producidas por infecciones víricas (por ejemplo, VIH) así como bacterianas o fúngicas, o pueden resultar de trastornos autoinmunitarios. Más específicamente, las enfermedades infecciosas producidas por infección vírica, bacteriana, fúngica u otra infección pueden ser tratables usando una proteína de la presente invención, incluyendo infecciones por VIH, virus de la hepatitis, herpesvirus, micobacterias, *Leishmania* spp., *malaria* spp. y diversas infecciones fúngicas tales como candidiasis. Por supuesto, a este respecto, una proteína de la presente invención también puede ser útil cuando puede desearse generalmente un refuerzo del sistema inmunitario, es decir, en el tratamiento del cáncer.

45 Los trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse usando una proteína de la presente invención incluyen, por ejemplo, enfermedad del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmunitaria, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia grave, enfermedad de injerto contra el huésped y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria. Tal proteína de la presente invención también puede ser útil en el tratamiento de reacciones y estados alérgicos, tales como asma (particularmente asma alérgica) u otros problemas respiratorios. Otros estados, en los que se desea una supresión inmunitaria (incluyendo, por ejemplo, trasplante de órganos), también pueden tratarse usando una proteína de la presente invención.

50 Usando las proteínas de la invención, también puede ser posible regular las respuestas inmunitarias de varias formas. La regulación por disminución puede ser en forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmunitaria ya en progreso o puede implicar impedir la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células T activadas pueden inhibirse suprimiendo las respuestas de células T o induciendo tolerancia específica en células T, o ambas. La inmunosupresión de las respuestas de células T es generalmente un proceso activo, no específico de antígeno que requiere una exposición continua de las células T al agente supresor. La tolerancia, que implica inducir una no receptividad o anergia en las células T, puede distinguirse de la inmunosupresión porque esta es generalmente específica de antígeno y persiste después de que haya cesado la exposición al agente de tolerancia. Operacionalmente, la tolerancia puede demostrarse mediante la carencia de una respuesta de células T tras la reexposición a un antígeno específico en ausencia del agente de tolerancia.

La regulación por disminución o prevención de una o más funciones de antígeno (incluyendo sin limitación funciones

de antígeno para linfocitos B (tales como, por ejemplo, B7), por ejemplo, impidiendo altos niveles de síntesis de linfocinas mediante células T activadas, será útil en situaciones de trasplante de tejido, piel y órgano y en enfermedad de injerto contra el huésped (EICH). Por ejemplo, el bloqueo de la función de células T debe dar como resultado una reducción en la destrucción de tejido en el trasplante de tejido. Normalmente, en trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como extraño por células T, seguido por una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de una molécula que inhibe o bloquea la interacción de un antígeno para linfocitos B7 con su(s) ligando(s) natural(es) o células inmunitarias (tales como una forma monomérica, soluble de un péptido que tiene actividad B7-2 solo o junto con una forma monomérica de un péptido que tiene una actividad de otro antígeno para linfocitos B (por ejemplo, B7-1, B7-3) o un anticuerpo bloqueante, antes del trasplante, puede conducir a la unión de la molécula al/a los ligando(s) natural(es) en las células inmunitarias sin transmitir la correspondiente señal coestimuladora. El bloqueo de la función de antígeno para linfocitos B en esta materia impide la síntesis de citocinas por células inmunitarias, tales como células T y por tanto actúa como un inmunosupresor. Además, la falta de coestimulación también puede ser suficiente para provocar la anergia de las células T, induciendo de ese modo tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo mediante reactivos bloqueantes del antígeno para linfocitos B puede evitar la necesidad de una administración repetida de estos reactivos bloqueantes. Para lograr una inmunosupresión o tolerancia suficientes en un sujeto, también puede ser necesario bloquear la función de una combinación de antígenos de linfocitos B.

La eficacia de los reactivos bloqueantes particulares en la prevención del rechazo de trasplantes de órganos o EICH puede evaluarse usando modelos animales que son predictivos de la eficacia en seres humanos. Los ejemplos de sistemas apropiados que pueden usarse incluyen injertos cardiacos alogénicos en ratas e injertos xenogénicos de células de los islotes pancreáticos en ratones, ambos de los cuales se han usado para examinar los efectos inmunosupresores de las proteínas de fusión CTLA4lg *in vivo* tal como se describe en Lenschow *et al.*, Science 257: 789-792 (1992) y Turka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 11102-11105 (1992). Además, pueden usarse modelos murinos de EICH (véase Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, págs 846-847) para determinar el efecto del bloqueo de la función de antígeno para linfocitos B *in vivo* sobre el desarrollo de esa enfermedad.

El bloqueo de la función de antígeno también puede ser terapéuticamente útil para tratar enfermedades autoinmunitarias. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de una activación inapropiada de las células T que son reactivas frente al propio tejido y que fomentan la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de células T autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. Puede usarse la administración de reactivos que bloquean la coestimulación de células T alterando las interacciones receptor:ligando de los antígenos de linfocitos B para inhibir la activación de células T y prevenir la producción de autoanticuerpos o citocinas derivadas de células T que pueden estar implicadas en el proceso de la enfermedad. Adicionalmente, los reactivos bloqueantes pueden inducir tolerancia específica de antígeno de células T autorreactivas que podría conducir a un alivio a largo plazo de la enfermedad. La eficacia de los reactivos bloqueantes en la prevención o alivio de los trastornos autoinmunitarios puede determinarse usando varios modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Los ejemplos incluyen encefalitis autoinmunitaria experimental murina, lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, artritis del colágeno autoinmunitaria murina, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB y miastenia grave experimental murina (véase Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, 1989, páginas 840-856).

La regulación por incremento de una función de antígeno (preferiblemente una función de antígeno para linfocitos B), como medio para regular por incremento respuestas inmunitarias, también puede ser útil en terapia. La regulación por incremento de las respuestas inmunitarias puede ser en forma de potenciación de una respuesta inmunitaria existente o de provocación de una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, la potenciación de una respuesta inmunitaria mediante la estimulación de una función de antígeno para linfocitos B puede ser útil en casos de infección vírica. Además, las enfermedades víricas sistémicas tales como gripe, resfriado común y encefalitis podrían aliviarse mediante la administración sistémica de formas estimuladoras de formas de antígenos de linfocitos B.

Como alternativa, pueden potenciarse las respuestas inmunitarias antivirales en un paciente infectado eliminando células T del paciente, coestimulando las células T *in vitro* con APC pulsadas con antígenos virales que expresan un péptido de la presente invención o bien junto con una forma estimuladora de un péptido soluble de la presente invención y reintroduciendo las células T activadas *in vitro* en el paciente. Otro procedimiento para potenciar las respuestas inmunitarias antivirales será aislar células infectadas de un paciente, transfectarlas con un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención tal como se describe en el presente documento de modo que las células expresen toda o una parte de la proteína sobre su superficie y reintroducir la células transfectadas en el paciente. Las células infectadas ahora pueden administrar una señal coestimuladora a y activar de ese modo, las células T *in vivo*.

En otra aplicación, la regulación por incremento o potenciación de una función de antígeno (preferiblemente una función de antígenos para linfocitos B) puede ser útil en la inducción de inmunidad tumoral. Pueden administrarse células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) transfectadas con un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de la presente invención a un sujeto para superar la

tolerancia específica de tumor en el sujeto. Si se desea, la célula tumoral puede transfectarse para expresar una combinación de péptidos. Por ejemplo, las células tumorales obtenidas de un paciente pueden transfectarse *ex vivo* con un vector de expresión que dirige la expresión de un péptido que tiene actividad de tipo B7-2 solo, o junto con un péptido que tiene actividad de tipo BT-1 y/o actividad de tipo BT-3. Las células tumorales transfectadas se devuelven al paciente para dar como resultado la expresión de los péptidos sobre la superficie de la célula transfectada. Como alternativa, pueden usarse técnicas de terapia génica para dirigirse a una célula tumoral para la transfección *in vivo*.

La presencia del péptido de la presente invención que tiene la actividad de un(os) antígeno(s) para linfocitos B sobre la superficie de la célula tumoral proporciona la señal de coestimulación necesaria a las células T para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células T frente a las células tumorales transfectadas. Además, pueden transfectarse células tumorales que carecen de las moléculas del MHC de clase I o del MHC de clase II, o que no pueden reexpresar cantidades suficientes de las moléculas del MHC de clase I o del MHC de clase II, con un ácido nucleico que codifica toda o una parte (por ejemplo, una parte truncada de un dominio citoplasmático) de una proteína de cadena α del MHC de clase I y una proteína de β_2 microglobulina o una proteína de cadena α del MHC de clase II y una proteína de cadena β del MHC de clase II para expresar de ese modo proteínas del MHC de clase I o del MHC de clase II sobre la superficie celular. La expresión del MHC de clase I o de clase II apropiado junto con un péptido que tiene la actividad de un antígeno para linfocitos B (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-3) induce una respuesta inmunitaria mediada por células T frente a la célula tumoral transfectada. Opcionalmente, un gen que codifica una construcción antisentido que bloquea la expresión de una proteína asociada al MHC de clase II, tal como la cadena invariante, también puede cotransfectarse con un ADN que codifica un péptido que tiene la actividad de un antígeno para linfocitos B para fomentar la presentación de antígenos asociados a tumor e inducir inmunidad específica de tumor. Por tanto, la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células T en un sujeto humano puede ser suficiente para superar la tolerancia específica de tumor en el sujeto.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos adecuados para determinar la citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed por J. E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128: 1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135: 1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bowman *et al.*, J. Virology 61: 1992-1998; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Brown *et al.*, J. Immunol. 153: 3079-3092, 1994.

Los ensayos para determinar respuestas de inmunoglobulina dependientes de células T y cambio de isotipo (que identificarán, entre otras, proteínas que modulan las respuestas de anticuerpo dependientes de células T y que afectan a los perfiles de Th1/Th2) incluyen, sin limitación, los descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144: 3028-3033, 1990; y Assays for B cell function: *In vitro* antibody production, Mond, J.J. y Brunswick, M. en Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. volumen 1 págs. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Los ensayos de reacción mixta de linfocitos (MLR) (que identificarán, entre otras, proteínas que generan predominantemente respuestas de Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek. D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai *et al.*, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140: 508-512, 1988; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1992.

Los ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otras, proteínas expresadas por células dendríticas que activan células T vírgenes) incluyen, sin limitación, los descritos en: Guery *et al.*, J. Immunol. 134: 536-544, 1995; Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 173: 549-559, 1991; Macatonia *et al.*, Journal of Immunology 154: 5071-5079, 1995; Porgador *et al.*, Journal of Experimental Medicine 182: 255-260, 1995; Nair *et al.*, Journal of Virology 67: 4062-4069, 1993; Huang *et al.*, Science 264: 961-965, 1994; Macatonia *et al.*, Journal of Experimental Medicine 169: 1255-1264, 1989; Bhardwaj *et al.*, Journal of Clinical Investigation 94: 797-807, 1994; e Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 172: 631-640, 1990.

Los ensayos para determinar la supervivencia/apoptosis de linfocitos (que identificarán, entre otras, proteínas que impiden la apoptosis tras la inducción por un superantígeno y proteínas que regulan la homeostasis de linfocitos) incluyen, sin limitación, los descritos en: Darzynkiewicz *et al.*, Cytometry 13: 795-808, 1992; Gorczyca *et al.*, Leukemia 7: 659-670, 1993; Gorczyca *et al.*, Cancer Research 53: 1945-1951, 1993; Itoh *et al.*, Cell 66: 233-243, 1991; Zacharchuk, Journal of Immunology 145: 4037-4045, 1990 ; Zamai *et al.*, Cytometry 14: 891-897, 1993; Gorczyca *et al.*, International Journal of Oncology 1: 639-648, 1992.

Los ensayos para detectar proteínas que influyen en las etapas tempranas del compromiso y desarrollo de células T

incluyen, sin limitación, los descritos en: Antica *et al.*, Blood 84: 111-117, 1994; Fine *et al.*, Cellular Immunology 155: 111-122, 1994; Galy *et al.*, Blood 85: 2770-2778, 1995; Toki *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7548-7551, 1991.

Actividad reguladora de la hematopoyesis

5 Una proteína de la presente invención puede ser útil en la regulación de la hematopoyesis y en consecuencia, en el tratamiento de deficiencias de células mieloides o linfoides. Incluso una actividad biológica marginal en apoyo de células formadoras de colonias o de líneas celulares dependientes de factor indica una implicación en la regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, para apoyar el crecimiento y proliferación de células progenitoras eritroides solas o en combinación con otras citocinas, indicando de ese modo utilidad, por ejemplo, en el tratamiento de diversas anemias o para su uso junto con irradiación/quimioterapia para estimular la producción de precursores eritroides y/o células eritroides; para apoyar el crecimiento y proliferación de células mieloides tales como granulocitos y monocitos/macrófagos (es decir, actividad de CSF tradicional) útiles, por ejemplo, junto con quimioterapia para impedir o tratar la mielosupresión consecuyente; para apoyar el crecimiento y proliferación de megacariocitos y en consecuencia de plaquetas permitiendo de ese modo la prevención o tratamiento de diversos trastornos plaquetarios tales como trombocitopenia y en general para su uso en lugar de, o complementario a, transfusiones de plaquetas; y/o para apoyar el crecimiento y proliferación de células madre hematopoyéticas que pueden madurar para dar todas y cada una de las células hematopoyéticas mencionadas anteriormente y por tanto encuentran utilidad terapéutica en diversos trastornos de células madre (tales como los tratados normalmente con trasplante, incluyendo, sin limitación, anemia aplásica y hemoglobinuria nocturna paroxismal), así como en la repoblación del compartimento de células madre tras la irradiación/quimioterapia, *in vivo* o bien *ex vivo* (es decir, junto con trasplante de médula ósea o con trasplante de células progenitoras periféricas (homólogas o heterólogas)) como células normales o manipuladas genéticamente para terapia génica.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

25 Los ensayos adecuados para determinar la proliferación y diferenciación de diversas líneas hematopoyéticas se citaron anteriormente.

Los ensayos para determinar la diferenciación de células madre embrionarias (que identificarán, entre otras, proteínas que influyen en la hematopoyesis de diferenciación embrionaria) incluyen, sin limitación, los descritos: Johansson *et al.* Cellular Biology 15: 141-151, 1995; Keller *et al.*, Molecular and Cellular Biology 13: 473-486, 1993; McClanahan *et al.*, Blood 81: 2903-2915, 1993.

30 Los ensayos para determinar la supervivencia y diferenciación de células madre (que identificarán, entre otras, proteínas que regulan la linfematopoyesis) incluyen, sin limitación, los descritos en: Methylcellulose colony forming assays, Freshney, M.G. en Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshney, *et al.* eds. volumen págs. 265-268, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY. 1994; Hirayama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5907-5911, 1992; Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potential, McNiece, I.K. y Briddell, R.A. en Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshney, *et al.* eds. volumen págs. 23-39, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY. 1994; Neben *et al.*, Experimental Hematology 22: 353-359, 1994; Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R.E. en Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshney, *et al.* eds. volumen págs. 1-21, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY. 1994; Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells, Spooncer, E., Dexter, M. y Allen, T. en Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshney, *et al.* eds. volumen págs. 163-179, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY. 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H.J. en Culture of Hematopoietic Cells. R.I. Freshney, *et al.* eds. volumen págs. 139-162, Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY. 1994.

Actividad de crecimiento de tejido

45 Una proteína de la presente invención también puede tener utilidad en composiciones usadas para el crecimiento o regeneración de huesos, cartílagos, tendones, ligamentos y/o tejido nervioso, así como para la cicatrización de heridas y reparación y sustitución de tejidos y en el tratamiento de quemaduras, incisiones y úlceras.

50 Una proteína de la presente invención, que induce el crecimiento de cartílago y/o hueso en circunstancias en las que normalmente no se forma hueso, tiene aplicación en la curación de fracturas óseas y daño o defectos en el cartílago en seres humanos y otros animales. Tal preparación que emplea una proteína de la invención puede tener uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas así como abiertas y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación de huesos *de novo* inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por traumatismo o inducidos por resección oncológica y también es útil en la cirugía plástica estética.

55 También puede usarse una proteína de la invención en el tratamiento de enfermedad periodontal y en otros procedimientos de reparación dental. Tales agentes pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de huesos, estimular el crecimiento de células formadoras de huesos o inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de huesos. Una proteína de la invención también puede ser útil en el tratamiento de la osteoporosis o artrosis, tal como mediante la estimulación de la reparación de huesos y/o cartílagos o bloqueando la inflamación o los procesos de destrucción de tejido (actividad colagénica, actividad de osteoclasto, etc) mediados

por procesos inflamatorios.

Otra categoría de actividad de regeneración de tejido que puede ser atribuible a la proteína de la presente invención es la formación de tendones/ligamentos. Una proteína de la presente invención, que induce la formación de tejido de tipo tendón/ligamento u otro tejido en circunstancias en las que no se forma normalmente tal tejido, tiene aplicación en la curación de desgarros de tendones o ligamentos, deformidades y otros defectos de tendones o ligamentos en seres humanos y otros animales. Tal preparación que emplea una proteína inductora de tejido de tipo tendón/ligamento puede tener uso profiláctico para prevenir el daño al tejido de tendón o ligamento, así como un uso en la fijación mejorada del tendón o ligamento al hueso y otros tejidos y en la reparación de defectos en tejido de tendón o ligamento. La formación *de novo* de tejido de tipo tendón/ligamento inducida por una composición de la presente invención contribuye a la reparación de defectos de tendones o ligamentos congénitos, inducidos por traumatismos u otros de otro origen y también es útil en la cirugía plástica estética para unir o reparar tendones o ligamentos. Las composiciones de la presente invención pueden proporcionar un entorno para atraer células formadoras de tendones o ligamentos, estimular el crecimiento de las células formadoras de tendones o ligamentos, inducir la diferenciación de progenitores de células formadoras de tendones o ligamentos, o inducir el crecimiento de células de tendones/ligamentos o progenitores *ex vivo* para devolverlas *in vivo* para efectuar la reparación de tejidos. Las composiciones de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de la tendinitis, síndrome del túnel carpiano y otros defectos de tendones o ligamentos. Las composiciones también pueden incluir una matriz y/o agente secuestrante apropiados como vehículo tal como se conoce bien en la técnica.

La proteína de la presente invención también puede ser útil para la proliferación de células neurales y para la regeneración de tejido nervioso y cerebral, es decir, para el tratamiento de enfermedades y neuropatías del sistema nervioso central y periférico, así como de trastornos mecánicos y por traumatismo, que implican degeneración, muerte o traumatismo en células neurales o tejido nervioso. Más específicamente, puede usarse una proteína en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como lesiones de nervio periférico, neuropatía periférica y neuropatías localizadas y enfermedades del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y síndrome de Shy-Drager. Otros estados que pueden tratarse según la presente invención incluyen trastornos mecánicos y por traumatismo, tales como trastornos de la médula espinal, traumatismo craneoencefálico y enfermedades cerebrovasculares tales como accidente cerebrovascular. Las neuropatías periféricas que resultan de quimioterapia u otras terapias médicas también pueden tratarse usando una proteína de la invención.

Las proteínas de la invención también pueden ser útiles para fomentar un mejor o más rápido cierre de heridas no cicatrizadas, incluyendo sin limitación úlceras por presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y por traumatismo y similares.

Se espera que una proteína de la presente invención también muestre actividad para la generación o regeneración de otros tejidos, tales como órganos (incluyendo, por ejemplo, páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco) y tejido vascular (incluyendo endotelio vascular), o para fomentar el crecimiento de células que comprenden tales tejidos. Parte de los efectos deseados pueden ser mediante la inhibición o modulación de la cicatrización fibrótica para permitir que se regenere el tejido normal. Una proteína de la invención también puede mostrar actividad angiogénica.

Una proteína de la presente invención también puede ser útil para la protección o regeneración intestinal y para el tratamiento de fibrosis pulmonar o hepática, lesión por reperfusión en diversos tejidos y estados que resultan del daño sistémico por citocinas.

Una proteína de la presente invención también puede ser útil para fomentar o inhibir la diferenciación de los tejidos descritos anteriormente a partir de células o tejidos precursores; o para inhibir el crecimiento de los tejidos descritos anteriormente.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos para determinar la actividad de generación de tejidos incluyen, sin limitación, los descritos en: publicación de patente internacional número WO95/16035 (hueso, cartílago, tendón); publicación de patente internacional número WO95/05846 (nervio, neuronal); publicación de patente internacional número WO91/07491 (piel, endotelio).

Los ensayos para determinar la actividad de curación de heridas incluyen, sin limitación, los descritos en: Winter, *Epidermal Wound Healing*, págs. 71-112 (Maibach, HI y Rovee, DT, eds.), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, modificado por Eaglstein y Mertz, J. Invest. Dermatol 71: 382-84 (1978).

Actividad de activina/inhibina

Una proteína de la presente invención también puede mostrar actividades relacionadas con activina o inhibina. Las inhibinas se caracterizan por su capacidad para inhibir la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH), mientras que las activinas se caracterizan por su capacidad para estimular la liberación de la hormona estimulante

del folículo (FSH). Por tanto, una proteína de la presente invención, sola o en heterodímeros con un miembro de la familia de las inhibinas, puede ser útil como anticonceptivo basándose en la capacidad de las inhibinas de reducir la fertilidad en mamíferos hembra y reducir la espermatogénesis en mamíferos macho. La administración de cantidades suficientes de otras inhibinas puede inducir esterilidad en estos mamíferos. Como alternativa, la proteína de la invención, como un homodímero o como un heterodímero con otras subunidades proteicas del grupo de la inhibina β , puede ser útil como un compuesto terapéutico inductor de fertilidad, basándose en la capacidad de las moléculas de activina para estimular la liberación de FSH a partir de células de la hipófisis anterior. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.798.885. Una proteína de la invención también puede ser útil para el avance de la aparición de fertilidad en mamíferos sexualmente inmaduros, de modo que se aumenta el rendimiento reproductor durante toda la vida de animales domésticos tales como vacas, ovejas y cerdos.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos para determinar la actividad de activina/inhibina incluyen, sin limitación, los descritos en: Vale *et al.*, *Endocrinology* 91: 562-572, 1972; Ling *et al.*, *Nature* 321: 779-782, 1986; Vale *et al.*, *Nature* 321: 776-779, 1986; Mason *et al.*, *Nature* 318: 659-663, 1985; Forage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3091-3095, 1986.

Actividad quimiotáctica/quimiocinética

Una proteína de la presente invención puede tener actividad quimiotáctica o quimiocinética (por ejemplo, actúa como una quimiocina) para células de mamífero, incluyendo, por ejemplo, monocitos, fibroblastos, neutrófilos, células T, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y/o endoteliales. Pueden usarse las proteínas quimiotácticas o quimiocinéticas para movilizar o atraer una población celular deseada hasta un sitio de acción deseado. Las proteínas quimiotácticas o quimiocinéticas proporcionan ventajas particulares en el tratamiento de heridas y otros traumatismos en tejidos, así como en el tratamiento de infecciones localizadas. Por ejemplo, la atracción de linfocitos, monocitos o neutrófilos hasta tumores o sitios de infección puede dar como resultado respuestas inmunitarias mejoradas frente al tumor o el agente infeccioso.

Una proteína o péptido tiene actividad quimiotáctica para una población celular particular si puede estimular, directa o indirectamente, la orientación o movimiento dirigido de tal población celular. Preferiblemente, la proteína o péptido tiene la capacidad de estimular directamente el movimiento de las células. Puede determinarse fácilmente si una proteína particular tiene actividad quimiotáctica para una población de células empleando tal proteína o péptido en cualquier ensayo conocido para determinar la quimiotaxis celular.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos para determinar la actividad quimiotáctica (que identificarán proteínas que inducen o impiden la quimiotaxis) consisten en ensayos que miden la capacidad de una proteína para inducir la migración de células a través de una membrana así como la capacidad de una proteína para inducir la adhesión de una población celular a otra población celular. Los ensayos adecuados para determinar el movimiento y adhesión incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 6.12, Measurement of alpha and beta Chemokines 6.12.1-6.12.28; Taub *et al.* *J. Clin. Invest.* 95: 1370-1376, 1995; Lind *et al.* *APMIS* 103: 140-146, 1995; Muller *et al.* *Eur. J. Immunol.* 25: 1744-1748; Gruber *et al.* *J. de Immunol.* 152: 5860-5867, 1994; Johnston *et al.* *J. of Immunol.* 153: 1762-1768, 1994.

Actividad hemostásica y trombolítica

Una proteína de la invención también puede mostrar actividad hemostásica o trombolítica. Como resultado, se espera que tal proteína sea útil en el tratamiento de diversos trastornos de coagulación (incluyendo trastornos hereditarios, tales como hemofilias) o para potenciar la coagulación y otros acontecimientos hemostásicos para tratar heridas que resultan de traumatismos, cirugía y otras causas. Una proteína de la invención también puede ser útil para disolver o inhibir la formación de trombos y para el tratamiento y prevención de estados que resultan de los mismos (tales como, por ejemplo, infarto de los vasos del sistema nervioso central y cardiacos (por ejemplo, accidente cerebrovascular)).

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos para determinar la actividad hemostásica y trombolítica incluyen, sin limitación, los descritos en: Linet *et al.*, *J. Clin. Pharmacol.* 26: 131-140, 1986; Burdick *et al.*, *Thrombosis Res.* 45: 413-419, 1987; Humphrey *et al.*, *Fibrinolysis* 5: 71-79 (1991); Schaub, *Prostaglandins* 35: 467-474, 1988.

Actividad de receptor/ligando

Una proteína de la presente invención también puede mostrar actividad como receptores, ligandos de receptor o

inhibidores o agonistas de las interacciones receptor/ligando. Los ejemplos de tales receptores y ligandos incluyen, sin limitación, receptores de citocina y sus ligandos, cinasas de receptor y sus ligandos, fosfatasas de receptor y sus ligandos, receptores implicados en interacciones célula-célula y sus ligandos (incluyendo sin limitación, moléculas de adhesión celular (tales como selectinas, integrinas y sus ligandos) y pares de receptor/ligando implicados en la presentación de antígenos, reconocimiento de antígenos y desarrollo de respuestas inmunitarias celulares y humorales). Los receptores y ligandos también son útiles para la selección de posibles inhibidores de molécula pequeña o peptídicos de la interacción relevante receptor/ligando. Una proteína de la presente invención (incluyendo, sin limitación, fragmentos de receptores y ligandos) puede ser útil por sí misma como inhibidor de las interacciones receptor/ligando.

La actividad de una proteína de la invención puede medirse, entre otros medios, mediante los siguientes procedimientos:

Los ensayos adecuados para determinar la actividad receptor-ligando incluyen sin limitación los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (capítulo 7.28, Measurement of Cellular Adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22), Takai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, J. Exp. Med. 168: 1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, J. Exp. Med. 169: 149-160 1989; Stoltenborg *et al.*, J. Immunol. Methods 175: 59-68, 1994; Stitt *et al.*, Cell 80: 661-670, 1995.

Actividad antiinflamatoria

Las proteínas de la presente invención también pueden mostrar actividad antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria puede lograrse proporcionando un estímulo a las células implicadas en la respuesta inflamatoria, inhibiendo o fomentando las interacciones célula-célula (tal como, por ejemplo, la adhesión celular), inhibiendo o fomentando la quimiotaxis de las células implicadas en el proceso inflamatorio, inhibiendo o fomentando la extravasación celular, o estimulando o suprimiendo la producción de otros factores que inhiben o fomentan más directamente una respuesta inflamatoria. Pueden usarse proteínas que muestran tales actividades para tratar estados inflamatorios incluyendo estados crónicos o agudos, que incluyen sin limitación inflamación asociada con infección (tal como choque séptico, septicemia o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), lesión por isquemia-reperusión, mortalidad por endotoxina, artritis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocina o quimiocina, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o que resulta de la sobreproducción de citocinas tales como TNF o IL-1. Las proteínas de la invención también son útiles para tratar la anafilaxis e hipersensibilidad a una sustancia o material antigénico.

Actividad de cadherina/supresora de la invasión tumoral

Las cadherinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio que parecen desempeñar papeles importantes durante el desarrollo, particularmente en la definición de tipos celulares específicos. La pérdida o alteración de la expresión normal de cadherina puede conducir a cambios en las propiedades de adhesión celular unidas al crecimiento tumoral y la metástasis. El mal funcionamiento de las cadherinas también está implicado en otras enfermedades humanas, tales como pénfigo vulgar y pénfigo foliaceo (enfermedades autoinmunitarias cutáneas con ampollas), enfermedad de Crohn y algunas anomalías del desarrollo.

La superfamilia de la cadherina incluye bastante más de cuarenta miembros, cada uno con un patrón de expresión diferenciado. Todos los miembros de la superfamilia tienen en común repeticiones extracelulares conservadas (dominios de cadherina), pero se encuentran diferencias estructurales en otras partes de la molécula. Los dominios de cadherina se unen al calcio para formar su estructura terciaria y por tanto se requiere calcio para mediar su adhesión. Solo unos pocos aminoácidos en el primer dominio de cadherina proporcionan la base de la adhesión homófila; la modificación de este sitio de reconocimiento puede cambiar la especificidad de una cadherina de modo que en lugar de reconocerse solo a sí misma, la molécula mutante ahora puede unirse también a una cadherina diferente. Además, algunas cadherinas participan en adhesión heterófila con otras cadherinas.

La E-cadherina, un miembro de la superfamilia de la cadherina, se expresa en tipos de células epiteliales. Patológicamente, si se pierde la expresión de E-cadherina en un tumor, las células malignas se vuelven invasivas y el cáncer experimenta metástasis. La transfección de líneas de células cancerígenas con polinucleótidos que expresan E-cadherina ha invertido los cambios asociados al cáncer, devolviendo las formas celulares alteradas a las normales, restaurando la adhesividad de las células entre sí y con su sustrato, disminuyendo la tasa de crecimiento celular y reduciendo drásticamente el crecimiento celular independiente de la unión. Por tanto, la reintroducción de la expresión de E-cadherina invierte los carcinomas a un estadio menos avanzado. Es probable que otras cadherinas tengan el mismo papel supresor de la invasión en carcinomas derivados de otros tipos de tejido. Por tanto, las proteínas de la presente invención con actividad de cadherina y los polinucleótidos de la presente invención que codifican tales proteínas, pueden usarse para tratar el cáncer. La introducción de tales proteínas o polinucleótidos en células cancerígenas puede reducir o eliminar los cambios cancerígenos observados en estas células proporcionando una expresión normal de cadherina.

También se ha mostrado que las células cancerígenas expresan cadherinas de un tipo de tejido diferente que su

origen, permitiendo así a estas células invadir y experimentar metástasis en un tejido diferente en el organismo. En estas células las cadherinas expresadas de manera inapropiada pueden sustituirse por las proteínas de la presente invención con actividad de cadherina y los polinucleótidos de la presente invención que codifican tales proteínas, restaurando las propiedades adhesivas celulares normales y reduciendo o eliminando la tendencia de las células a la metástasis.

Adicionalmente, las proteínas de la presente invención con actividad de cadherina y los polinucleótidos de la presente invención que codifican tales proteínas, pueden usarse para generar anticuerpos que reconocen y se unen a las cadherinas. Tales anticuerpos pueden usarse para bloquear la adhesión de cadherinas de células tumorales expresadas de manera inapropiada, impidiendo que las células formen un tumor en otra parte. Tal anticuerpo anti-cadherina también puede usarse como un marcador del grado, tipo patológico y pronóstico de un cáncer, es decir, cuanto más avanzado esté el cáncer, menos expresión de cadherina habrá y esta disminución en la expresión de cadherina puede detectarse mediante el uso de un anticuerpo de unión a cadherina.

Los fragmentos de proteínas de la presente invención con actividad de cadherina, preferiblemente un polipéptido que comprende un decapeptido del sitio de reconocimiento de la cadherina y los polinucleótidos de la presente invención que codifican tales fragmentos de proteínas, también pueden usarse para bloquear la función de la cadherina uniéndose a las cadherinas e impidiendo que se unan en formas que produzcan efectos no deseados. Adicionalmente, los fragmentos de proteínas de la presente invención con actividad de cadherina, preferiblemente fragmentos de cadherina solubles truncados, que se ha descubierto que son estables en la circulación de pacientes con cáncer y los polinucleótidos que codifican tales fragmentos de proteínas, pueden usarse para alterar la adhesión célula-célula apropiada.

Los ensayos para determinar la actividad adhesiva de cadherina y la actividad supresora invasiva incluyen, sin limitación, los descritos en: Hortsch *et al.* J Biol Chem 270 (32): 18809-18817, 1995; Miyaki *et al.* Oncogene 11: 2547-2552, 1995; Ozawa *et al.* Cell 63: 1033-1038, 1990.

Actividad de inhibición tumoral

Además de las actividades descritas anteriormente para el tratamiento inmunológico o prevención de tumores, una proteína de la presente invención puede mostrar otras actividades antitumorales. Una proteína puede inhibir el crecimiento tumoral directa o indirectamente (tal como, por ejemplo, mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)). Una proteína puede mostrar su actividad inhibidora de tumores actuando sobre el tejido tumoral o el tejido precursor de tumores, inhibiendo la formación de tejidos necesarios para soportar el crecimiento tumoral (tales como, por ejemplo, inhibiendo la angiogénesis), provocando la producción de otros factores, agentes o tipos celulares que inhiben el crecimiento tumoral, o suprimiendo, eliminando o inhibiendo factores, agentes o tipos celulares que fomentan el crecimiento tumoral.

Otras actividades

Una proteína de la invención también puede mostrar una o más de las siguientes actividades o efectos adicionales: inhibición del crecimiento, infección o función de, o destrucción de, agentes infecciosos, incluyendo, sin limitación, bacterias, virus, hongos y otros parásitos; afectación (supresión o potenciación) de características corporales, incluyendo, sin limitación, altura, peso, color del pelo, color de los ojos, piel, proporción de grasa a magro u otra pigmentación de tejido, o el tamaño o la forma de un órgano o parte del cuerpo (tal como, por ejemplo, aumento o disminución de pecho, cambio en la forma o conformación ósea), afectación de los biorritmos o ciclos o ritmos circadianos; afectación de la fertilidad de sujetos macho o hembra; afectación del metabolismo, catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización, almacenamiento o eliminación de grasas, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, cofactores dietéticos u otros factores o componente(s) nutricionales; afectación de características de comportamiento, incluyendo, sin limitación, apetito, libido, estrés, cognición (incluyendo trastornos cognitivos), depresión (incluyendo trastornos depresivos) y comportamientos violentos; proporcionamiento de efectos analgésicos u otros efectos de reducción del dolor; fomento de la diferenciación y crecimiento de células madre embrionarias en linajes diferentes de los linajes hematopoyéticos; actividad hormonal o endocrina; en el caso de enzimas, corrección de deficiencias de la enzima y tratamiento de enfermedades relacionadas con la deficiencia; tratamiento de trastornos hiperproliferativos (tales como, por ejemplo, psoriasis); actividad de tipo inmunoglobulina (tal como, por ejemplo, la capacidad de unirse a antígenos o al complemento); y la capacidad de actuar como un antígeno en una composición de vacuna para producir una respuesta inmunitaria frente a tal proteína u otro material o entidad que tiene reactividad cruzada con tal proteína.

Administración y dosificación

Una proteína de la presente invención (derivada de cualquier fuente, incluyendo sin limitación de fuentes recombinantes y no recombinantes) puede usarse en una composición farmacéutica cuando se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal composición también puede contener (además de una proteína y un vehículo) diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del/de los principio(s) activo(s). Las características del vehículo dependerán de la vía de

administración. La composición farmacéutica descrita en el presente documento también puede contener citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes que potencian la actividad de la proteína o bien complementan su actividad o uso en el tratamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína de la invención, o para minimizar los efectos secundarios. A la inversa, puede incluirse una proteína de la presente invención en las formulaciones de citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio particulares para minimizar los efectos secundarios de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico o agente antiinflamatorio.

Una proteína de la presente invención puede ser activa en multímeros (por ejemplo, heterodímeros u homodímeros) o complejos consigo misma u otras proteínas. Como resultado, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una proteína de la invención en tal forma multimérica o complejada.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en forma de un complejo de la(s) proteína(s) de la presente invención junto con antígenos proteicos o peptídicos. El antígeno proteico y/o peptídico administrará una señal estimuladora tanto a linfocitos B como T. Los linfocitos B responderán al antígeno a través de su receptor de inmunoglobulina de superficie. Los linfocitos T responderán al antígeno a través del receptor de células T (TCR) tras la presentación del antígeno por proteínas del MHC. Las proteínas del MHC y estructuralmente relacionadas incluyendo las codificadas por los genes del MHC de clase I y de clase II sobre células huésped servirán para presentar el/los antígeno(s) peptídico(s) a los linfocitos T. Los componentes antigénicos también pueden suministrarse como complejos MHC-peptido purificados solos o con moléculas coestimuladoras que pueden señalar directamente células T. Como alternativa, pueden combinarse anticuerpos que pueden unirse a inmunoglobulinas de superficie y otras moléculas sobre células B así como anticuerpos que pueden unirse al TCR y otras moléculas sobre células T, con la composición farmacéutica de la invención.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en forma de un liposoma en el que la proteína de la presente invención se combina, además de con otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas lamelares en disolución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales formulaciones liposomiales está dentro del conocimiento en la técnica, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense número 4.235.871; la patente estadounidense número 4.501.728; la patente estadounidense número 4.837.028 y la patente estadounidense número 4.737.323.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada principio activo de la composición farmacéutica o procedimiento que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, es decir, tratamiento, curación, prevención o mejora del estado médico relevante, o un aumento en la velocidad de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales estados. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado solo, la expresión se refiere a ese principio solo. Cuando se aplica a una combinación, la expresión se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o de manera simultánea.

En la práctica del uso médico de la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención a un mamífero que tiene un estado que ha de tratarse. La proteína de la presente invención puede administrarse bien sola o bien en combinación con otras terapias tales como tratamientos que emplean citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos. Cuando se administra conjuntamente con una o más citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos, la proteína de la presente invención puede administrarse de manera simultánea con la(s) citocina(s), linfocina(s) u otro(s) factor(es) hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos, o bien de manera secuencial. Si se administra de manera secuencial, el médico encargado decidirá la secuencia apropiada de administración de la proteína de la presente invención en combinación con citocina(s), linfocina(s), otro(s) factor(es) hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos.

La administración de la proteína de la presente invención usada en la composición farmacéutica o para poner en práctica el uso médico de la presente invención puede llevarse a cabo de una variedad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa al paciente.

Cuando se administra por vía oral una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la presente invención, la proteína de la presente invención estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, disolución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo contienen desde aproximadamente el 5% hasta el 95% de proteína de la presente invención y preferiblemente desde aproximadamente el 25% hasta el 90% de proteína de la presente invención. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de semilla de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica

puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacárido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente el 0,5% en peso hasta el 90% en peso de proteína de la presente invención y preferiblemente desde aproximadamente el 1% hasta el 50% de proteína de la presente invención.

5 Cuando se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de la presente invención, la proteína de la presente invención estará en forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos. La preparación de tales disoluciones de proteína parenteralmente aceptables, con la debida atención al pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro del conocimiento en la técnica. Una composición farmacéutica para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además
10 de una proteína de la presente invención, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer con lactato u otro vehículo tal como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica descrita en el presente documento también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la técnica.

15 La cantidad de proteína de la presente invención en la composición farmacéutica descrita en el presente documento dependerá de la naturaleza y gravedad del estado que va a tratarse y de la naturaleza de los tratamientos anteriores a los que se ha sometido el paciente. En última instancia, el médico encargado decidirá la cantidad de proteína de la presente invención con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico encargado administrará dosis bajas de la proteína de la presente invención y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis
20 mayores de la proteína de la presente invención hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo para el paciente y en ese punto no se aumentará más la dosificación. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas para poner en práctica el uso médico de la presente invención deben contener de aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 100 mg (preferiblemente de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 1 mg) de proteína de la presente invención por kg
25 de peso corporal.

La duración del tratamiento intravenoso usando la composición farmacéutica descrita en el presente documento variará dependiendo de la gravedad de la enfermedad que está tratándose y el estado y posible respuesta idiosincrática de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la proteína de la presente invención estará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En última
30 instancia, el médico encargado decidirá la duración apropiada del tratamiento intravenoso usando la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

La proteína de la invención también puede usarse para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con la proteína. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye sin limitación un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo
35 quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo con injerto de CDR, un anticuerpo humanizado, o fragmentos de los mismos que se unen a la proteína indicada. Tal término también incluye cualquier otra especie derivada de un anticuerpo o secuencia de anticuerpo que puede unirse a la proteína indicada.

Pueden producirse anticuerpos frente a una proteína particular mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante generación de
40 hibridomas que producen anticuerpos según procedimientos conocidos (véase por ejemplo, Goding, 1983, *Monoclonal Antibodies: principles and practice*, Academic Press Inc., Nueva York; y Yokoyama, 1992, "Production of Monoclonal Antibodies" en *Current Protocols in Immunology*, Unit 2.5, Greene Publishing Assoc. y John Wiley & Sons). Pueden producirse anticuerpos y sueros policlonales mediante inoculación de un sujeto mamífero con la proteína relevante o fragmentos de la misma según procedimientos conocidos. Pueden producirse fragmentos de
45 anticuerpos, receptores u otros péptidos reactivos a partir de los anticuerpos correspondientes mediante rotura y recogida, de los fragmentos deseados según procedimientos conocidos (véase por ejemplo, Goding, mencionado anteriormente; y Andrew *et al.*, 1992, "Fragmentation of Immunoglobulins" en *Current Protocols in Immunology*, Unit 2.8, Greene Publishing Assoc. y John Wiley & Sons). También pueden producirse anticuerpos quiméricos y anticuerpos de cadena sencilla según procedimientos recombinantes conocidos (véanse por ejemplo, los
50 documentos 5.169.939, 5.194.594 y 5.576.184). También pueden prepararse anticuerpos humanizados a partir de anticuerpos murinos correspondientes según procedimientos bien conocidos (véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5.530.101, 5.585.089 y 5.693.762). Adicionalmente, pueden producirse anticuerpos humanos en animales no humanos tales como ratones que se han alterado genéticamente para expresar moléculas de anticuerpo humano (véase por ejemplo Fishwild *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851; Mendez *et al.*,
55 1997, *Nature Genetics* 15: 146-156 (fe de errata de *Nature Genetics* 16: 410); y las patentes estadounidenses 5.877.397 y 5.625.126). Tales anticuerpos pueden obtenerse usando la proteína entera o bien fragmentos de la misma como inmunógeno. Adicionalmente, los inmunógenos de péptido pueden contener un residuo de cisteína en el extremo carboxilo-terminal y se conjugan con un hapteno tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Los procedimientos para sintetizar tales péptidos se conocen en la técnica, por ejemplo, como en R. P. Merrifield, J.
60 Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, *et al.*, *FEBS Lett.* 211, 10 (1987).

Los anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína de la invención pueden ser agentes de diagnóstico útiles

para la inmunodetección de la proteína. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que se unen a la proteína también pueden ser agentes terapéuticos útiles tanto para estados asociados con la proteína como también en el tratamiento de algunas formas de cáncer en las que está implicada la expresión anómala de la proteína. En el caso de células cancerosas o células leucémicas, los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra la proteína pueden ser útiles para detectar y prevenir la expansión metastásica de las células cancerosas, que puede estar mediada por la proteína.

Para las composiciones descritas en el presente documento que son útiles para la regeneración de huesos, cartílagos, tendones o ligamentos, el procedimiento terapéutico incluye administrar la composición por vía tópica, sistemática o local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, en una forma libre de pirógenos, fisiológicamente aceptable. Además, la composición puede estar de manera deseable encapsulada o inyectarse en una forma viscosa para su administración al sitio del daño en el hueso, cartilago o tejido. La administración tópica puede ser adecuada para la cicatrización de heridas y reparación de tejidos. Como alternativa o adicionalmente, en los procedimientos descritos en el presente documento, pueden administrarse simultánea o secuencialmente con la composición, agentes terapéuticamente útiles distintos de una proteína de la invención que también pueden incluirse opcionalmente en la composición tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, para la formación de huesos y/o cartílagos, la composición incluirá una matriz que puede administrar la composición que contiene proteína al sitio del daño en el hueso y/o cartilago, proporcionando una estructura para desarrollar hueso y cartilago que de manera óptima puede resorberse en el cuerpo. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cosmético y propiedades de superficie de contacto. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las posibles matrices para las composiciones pueden ser sulfato de calcio, fosfato de tricalcio, hidroxiapatita, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros posibles materiales son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Otras matrices están compuestas por proteínas puras o componentes de matriz extracelular. Otras posibles matrices no son biodegradables y están químicamente definidas, tales como hidroxiapatita sinterizada, biovidrio, aluminatos u otras cerámicas. Las matrices pueden estar compuestas por combinaciones de cualquiera de los tipos de material mencionados anteriormente, tales como poli(ácido láctico) e hidroxiapatita o colágeno y fosfato de tricalcio. Las biocerámicas pueden tener su composición alterada, tales como en aluminato-fosfato de calcio y procesarse para alterar el tamaño de poro, tamaño de partícula, forma de partícula y biodegradabilidad.

En el presente documento, se prefiere un copolímero 50:50 (peso molecular) de ácido láctico y ácido glicólico en forma de partículas porosas que tienen diámetros que oscilan entre 150 micrómetros y 800 micrómetros. En algunas aplicaciones, será útil utilizar un agente secuestrante, tal como carboximetilcelulosa o coágulo de sangre autóloga, para evitar que las composiciones de proteína se disocien de la matriz.

Una familia preferida de agentes secuestrantes son los materiales celulósicos tales como alquilcelulosas (incluyendo hidroxialquilcelulosas), incluyendo metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa, siendo las más preferidas las sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen ácido hialurónico, alginato de sodio, poli(etilenglicol), poli(óxido de oxietileno), polímero de carboxivinilo y poli(alcohol vinílico). La cantidad de agente secuestrante útil en el presente documento es del 0,5-20% en peso, preferiblemente del 1-10% en peso basándose en el peso de formulación total, que representa la cantidad necesaria para impedir la desorción de la proteína de la matriz polimérica y para proporcionar un manejo apropiado de la composición, pero no tanto como para que se impida que las células progenitoras se infiltren en la matriz, proporcionando así a la proteína la oportunidad de ayudar en la actividad osteogénica de las células progenitoras.

En otras composiciones, las proteínas de la invención pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto en huesos y/o cartílagos, heridas o tejidos en cuestión. Estos agentes incluyen diversos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factores transformadores de crecimiento (TGF- α y TGF- β) y factor de crecimiento similar a insulina (IGF).

Las composiciones terapéuticas también son valiosas en el presente documento para aplicaciones veterinarias. Particularmente, los animales domésticos y caballos de pura sangre, además de los seres humanos, son pacientes deseados para tal tratamiento con proteínas de la presente invención.

El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene proteína que debe usarse en la regeneración de tejidos se determinará por el médico encargado considerando diversos factores que modifican la acción de las proteínas, por ejemplo, cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio del daño, el estado del tejido dañado, el tamaño de una herida, tipo de tejido dañado (por ejemplo, hueso), la edad, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, momento de administración y otros factores clínicos. La dosificación puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y con la inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF I (factor I de

crecimiento similar a insulina), en la composición final, también puede afectar a la dosificación. Puede controlarse el progreso mediante evaluaciones periódicas del crecimiento y/o reparación del tejido/hueso, por ejemplo, rayos X, determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.

5 Los polinucleótidos de la presente invención también pueden usarse para la terapia génica. Tales polinucleótidos pueden introducirse *in vivo* o bien *ex vivo* en células para su expresión en un sujeto mamífero. Los polinucleótidos de la invención también pueden administrarse mediante otros procedimientos conocidos para la introducción de ácido nucleico en una célula u organismo (incluyendo, sin limitación, en forma de vectores virales o ADN desnudo).

10 También pueden cultivarse células *ex vivo* en presencia de proteínas de la presente invención con el fin de hacerlas proliferar o producir un efecto deseado sobre, o actividad en, tales células. Las células tratadas pueden introducirse entonces *in vivo* para fines terapéuticos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. En el presente documento se incorporan los contenidos del listado de secuencias.

Ejemplos

Identificación y caracterización del clon "hGIL-19/AE289"

15 Se ha identificado un polinucleótido de la presente invención como el clon "hGIL-19/AE289". Se aisló el clon hGIL-19/AE289 según el siguiente procedimiento. Se identificó una EST murina a partir de una biblioteca de ADNc murino preparada a partir de esplenocitos activados tanto con ConA como con células dendríticas derivadas de médula ósea. Se identificó la EST usando procedimientos que son selectivos para ADNc que codifican proteínas secretadas (véase la patente estadounidense número 5.536.637). Se usó la secuencia EST murina para aislar un clon murino
20 de longitud completa de la misma biblioteca de ADNc. El análisis de la secuencia del clon murino reveló una homología significativa con interleucina-10 (IL-10).

Con el fin de aislar un homólogo humano del clon murino, se construyeron cebadores de PCR basándose en la región de la secuencia murina que mostraba homología con IL-10. El uso de tales cebadores para la amplificación en una biblioteca de CMSP humanas produjo un producto de PCR de tamaño significativo. El análisis de la
25 secuencia del producto de PCR confirmó que era un homólogo de ADNc murino. Se construyeron oligonucleótidos a partir de la secuencia del clon humano parcial y se usaron para aislar un clon humano de longitud completa a partir de la biblioteca de CMSP.

La hGIL-19/AE289 es un clon humano de longitud completa, que incluye toda la secuencia codificante de una proteína secretada (también denominada en el presente documento proteína "hGIL-19/AE289"). El análisis de su
30 secuencia de aminoácidos indicó que tenía aproximadamente el 23% de homología con hIL-10. Basándose en los supuestos motivos de unión a receptor en IL-10, se propusieron tres motivos implicados con una función análoga en hGIL-19/AE289 mediante modelización informática. Estos son las regiones de SEC ID N.º: 2 desde el residuo 50 hasta el 60, desde el residuo 63 hasta el 81 y desde el residuo 168 hasta el 177. El análisis de bases de datos reveló que hGIL-19 también muestra niveles similares de homología con IL-10 de otras especies.

35 La secuencia de nucleótidos de hGIL-19/AE289 tal como se determinó por el presente documento se notifica en SEC ID N.º: 1 e incluye una cola de poli(A). La secuencia de aminoácidos de la proteína hGIL-19/AE289 correspondiente a la secuencia de nucleótidos anterior se notifica en SEC ID N.º: 2.

Caracterización de proteína hGIL-19/AE289

40 Se crearon líneas celulares que expresaban de manera estable y secretaban proteína hGIL-19/AE289 de longitud completa, transfectando células CHO con ADNc de hGIL-19/AE289 en vectores de expresión apropiados. Se usaron células COS transitoriamente transfectadas usando vectores de expresión de hGIL-19/AE289 apropiados para preparar proteína hGIL-19/AE289 para el análisis. Las transfecciones se lograron usando el reactivo Lipofectamine (Gibco) disponible comercialmente. De manera interesante, se observó que las células COS que expresaban hGIL-19 se separaban de manera no uniforme, formando agujeros en la monocapa de cultivo celular. Se usaron medios
45 condicionados mediante células COS transfectadas para demostrar actividad de tipo citocina de la proteína hGIL-19/AE289. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de lisados celulares mostró que el Stat-3 se fosforila (activa) en una línea celular derivada de tejido mesangial del riñón que mostraban calidades de tipo macrófago (MES-13; véase, Dumoutier *et al* (2000) *J. of Immunology* 164: 1814-1819) tras exponerse la célula a medios condicionados mediante células que expresaban hGIL-19/AE289. Además se induce la fosforilación de Stat-3 en
50 células COS no transfectadas que se tratan con proteína hGIL-19.

El análisis electroforético de proteína hGIL-19/AE289 (derivada a partir de líneas de células COS transfectadas descritas en el presente documento) indicó que la proteína expresada existe en un intervalo de tamaños. El tratamiento de proteína hGIL-19 derivada de COS con N-glucanasa antes de la electroforesis da como resultado una
55 única banda que corresponde a la especie de mayor movilidad (por ejemplo el menor peso molecular) observada en hGIL-19/AE289 sin tratar. Esto es coherente con los acontecimientos de glucosilación propuestos que pueden producirse en los supuestos sitios de glucosilación unida a N identificados en la secuencia de aminoácidos de hGIL-

19/AE289 (residuos de aminoácidos 54-56, 68-70, 97-99 y 176-178 de SEC ID N.º: 2).

La secuenciación N-terminal de Edman determinó que el extremo N-terminal de la proteína hGIL-19/AE289 madura comienza en el residuo en la posición 34 de SEC ID N.º: 2 (alanina). Se crearon vectores de expresión que fusionan una etiqueta de afinidad de "6x histidina" y una etiqueta de epítipo FLAG con el extremo N-terminal de la proteína hGIL-19/AE289 madura. (La etiqueta de aminoácidos añadida se facilita en SEC ID N.º: 3 y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MKFLVNVALLVFMVVYISYIYAGSGHHHHHGGSDYKDDDDKAPISSHCR).

Se usaron estas construcciones marcadas con etiqueta para crear líneas de células CHO que expresaban de manera estable y líneas de células CHO que expresaban de manera transitoria. Las etiquetas proporcionaron un medio conveniente para detectar hGIL-19/AE289 (por ejemplo, anticuerpos anti-6xhis; anticuerpos anti-FLAG) y para purificar la proteína a partir de medios condicionados (usando resina Ni²⁺). La proteína GIL-19 humana purificada mediante esta etiqueta a partir de las líneas de células COS que expresaban hGIL-19/AE289 pudieron usarse para inducir la activación de Stat-3 en células MES-13.

La comparación de transcritos de ARNm de hGIL-19 en células Th1 y Th2 activadas (véase, por ejemplo, Syrbe *et al*, (1999) Springer Seminars in Immunopathology, 21: 263-85) indicó un nivel sustancialmente superior de expresión de GIL-19 en células Th1 activadas que en células Th2 activadas. El análisis de ARNm de GIL-19 se logró con ensayos de protección con ARNasa.

Efectos inmunológicos de GIL-19

Se investigaron los efectos inmunológicos de GIL-19 en un contexto metazoario mediante introducción viral del ADNc de GIL-19 murina en ratones. Se usó un vector adenoviral para expresar un ADNc de GIL-19 murina en ratones hembra C57/B6 de 8 semanas de edad mediante inyección de 5×10^{10} partículas virales. Se sacrificaron los ratones de prueba a los 7 y 14 días tras la inyección y se compararon con ratones control a los que se inyectó tampón solo o con adenovirus que expresaba proteína verde fluorescente (GFP). En los días 7 y 14, se observó que los pesos tímicos absolutos y relativos estaban reducidos significativamente en los ratones que expresaban la GIL-19 murina viral. El peso medio absoluto del bazo estaba reducido en el día 14 y los pesos del hígado estaban ligeramente aumentados en el día 7. Una atrofia generalizada macroscópica del timo así como depleción linfocítica (observada microscópicamente) resultó aparente en los días 7 y 14.

Además, hubo varios efectos hematológicos que resultaron aparentes el día 7, incluyendo reducción del hemograma, hemoglobina y hematocritos. Estos efectos tomados juntos indicaron anemia en los animales. Además, hubo un aumento de las plaquetas así como un aumento de la fórmula leucocítica debido a un aumento de neutrófilos. A la luz de estas observaciones no hubo evidencias de una respuesta regenerativa, lo que indicó que los efectos pueden ser a nivel de la médula ósea.

Además, hubo un ligero descenso de los niveles de albúmina en el día 7 y el día 14. Una posible causa para esto es la pérdida de moléculas pequeñas a través del riñón o el intestino.

Realizaciones adicionales

En vista de lo anterior, se apreciará que las realizaciones adicionales de la presente invención son las siguientes:

A. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1;

(b) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601;

(c) la secuencia de nucleótidos de la secuencia que codifica la proteína de longitud completa del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de longitud completa codificada por el inserto de ADN del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

(e) la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica la proteína madura del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

(f) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína madura codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231;

(g) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2;

(h) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende un fragmento de la secuencia de

aminoácidos de SEC ID N.º: 2, comprendiendo el fragmento ocho aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2;

(i) la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que hibrida en condiciones al menos tan restrictivas como SSC 4X a 65 grados C, o SSC 4X a 42 grados C con formamida al 50%, para uno cualquiera de los polinucleótidos especificados por (a)-(f); y

5 (j) la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que hibrida en condiciones al menos tan restrictivas como SSC 4X a 50 grados C, o SSC 6X a 40 grados C con formamida al 50%, para uno cualquiera de los polinucleótidos especificados por (a)-(f); y que tiene una longitud que es al menos el 25% de la longitud de SEC ID N.º: 1.

B. El polinucleótido de acuerdo con la realización A en el que dicho polinucleótido está operativamente unido a al menos una secuencia de control de expresión.

10 C. Una célula huésped transformada con el polinucleótido de la realización B.

D. La célula huésped de la realización C, en la que dicha célula es una célula de mamífero.

E. Un procedimiento para producir una proteína codificada por el polinucleótido de la realización B, procedimiento que comprende:

15 (a) cultivar un cultivo de una célula huésped transformada con el polinucleótido de la realización B en un medio de cultivo adecuado; y

(b) purificar dicha proteína a partir del cultivo.

F. Una proteína producida de acuerdo con el procedimiento de la realización E.

G. Una proteína aislada que codifica la proteína de la realización F.

20 H. El polinucleótido de la realización G, en el que el polinucleótido comprende el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con número de acceso ATCC 207231.

I. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2;

(b) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2, comprendiendo el fragmento ocho aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2; y

25 (c) la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositada con número de acceso ATCC 207231;

estando la proteína esencialmente libre de otras proteínas de mamíferos.

J. La proteína de la realización I, en la que dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2.

K. Una composición que comprende la proteína de la realización I y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 L. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º:1.

M. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º:1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601.

35 N. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de la secuencia que codifica la proteína de longitud total del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231.

O. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido codifica la proteína de longitud total codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231.

40 P. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica la proteína madura de hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231.

Q. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido codifica una proteína madura codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231.

R. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2.

45 S. El polinucleótido de la realización A, en el que el polinucleótido codifica una proteína que comprende un

fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2, comprendiendo el fragmento ocho aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2.

T. La proteína de la realización 1, en la que la proteína comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2, comprendiendo el fragmento ocho aminoácidos contiguos de SEC ID N.º: 2.

5 U. La proteína de la realización 1, en la que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del clon hGIL-19/AE289 depositado con el número de acceso ATCC 207231.

V. Un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con una proteína de la realización 1.

Equivalentes

10 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando tan solo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que las siguientes reivindicaciones abarquen tales equivalentes.

Listado de secuencias

<110> GENETICS INSTITUTE

<120> PROTEÍNAS GIL-19/AE289 HUMANAS Y POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LAS MISMAS

15 <130> GIN-5358CPPC

<140>

<141>

<150> 60/131.473

<151> 28-04-1999

20 <160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1177

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

ggccaaagag gcctacaggt tctccttccc cagtcaccag ttgctcgagt tagaattgtc 60
tgcaatggcc gccctgcaga aatctgtgag ctctttcctt atggggaccc tggccaccag 120
ctgcctcctt ctcttggcc tcttggtaca gggaggagca gctgcgcca tcagctccca 180
ctgcaggctt gacaagtcca acttccagca gccctatata accaaccgca ccttcatgct 240
ggctaaggag gctagcttgg ctgataacaa cacagacgtt cgtctcattg gggagaaact_300
gttccacgga gtcagtatga gtgagcgctg ctatctgatg aagcagggtgc tgaacttcac 360
ccttgaagaa gtgctgttcc ctcaatctga taggttccag ccttatatgc aggagggtgg 420
gcccttctg gccaggctca gcaacaggct aagcacatgt catattgaag gtgatgacct 480
gcatatccag aggaatgtgc aaaagctgaa ggacacagtg aaaaagcttg gagagagtgg 540
agagatcaaa gcaattggag aactggattt gctgtttatg tctctgagaa atgcctgcat 600
ttgaccagag caaagctgaa aaatgaataa ctaacccctt tccctgcta gaaataacaa 660
ttagatgcc caaagcgatt ttttttaacc aaaaggaaga tgggaagcca aactccatca 720
tgatgggtgg attccaaatg aaccctgctg ttagttacaa aggaaaccaa tgccactttt 780
gtttataaga ccagaaggta gactttctaa gcatagatat ttattgataa catttcattg 840
taactggtgt tctatacaca gaaaacaatt tattttttaa ataattgtct ttttccataa 900
aaaagattac tttccattcc tttaggggaa aaaaccctta aatagcttca tgtttccata 960
atcagtactt tatatttata aatgtattta ttattattat aagactgcat tttatttata 1020
tcattttatt aatattgatt tatttataga aacatcattc gatattgcta cttgagtgta 1080
aggctaatat tgatatttat gacaataatt atagagctat aacatgttta tttgacctca 1140
ataaacactt ggatattccta aaaaaaaaaa aaaaaaa 1177
    
```

<210> 2

<211> 179

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
 1 5 10 15

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
 20 25 30

Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln
 35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
 50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
 65 70 75 80

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
 85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
 100 105 110

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg
 115 120 125

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
 130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
 145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
 165 170 175

Ala Cys Ile

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es una variante alélica que tiene al menos el 95% de identidad con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1;
- 5 (b) la secuencia de nucleótidos de SEC ID N.º: 1 desde el nucleótido 65 hasta el nucleótido 601;
- (c) la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica proteína de longitud total del clon hGIL-19/AE289 depositado con número de acceso ATCC 207231;
- (d) la secuencia de nucleótidos de una secuencia que codifica proteína madura del clon hGIL-19/AE289 depositado con número de acceso ATCC 207231;
- 10 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2; y
- (f) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 2 desde el aminoácido 34 hasta el 179 para su uso en terapia o diagnóstico,
- en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que induce fosforilación de Stat-3.
- 15 2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que dicha identidad porcentual con dicha secuencia de nucleótidos es al menos del 99%.
3. El polinucleótido de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho polinucleótido está operativamente unido a al menos una secuencia de control de expresión.
4. Una proteína codificada por el polinucleótido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 5. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a la proteína según se define en la reivindicación 4.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo con injerto de CDR y un anticuerpo humanizado.
- 25 8. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
9. El anticuerpo de la reivindicación 7 u 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9 para su uso en el tratamiento o prevención de artritis.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en el que la artritis es artritis reumatoide.

30

Especie: mus musculus Tejido: Bazo
 Tipo de célula: N/A

```

1 GAATTCGGCC AAAGAGGCCT ACCTAAACAG GCTCTCCTCT CAGTTATCAA
51 CTGTTGACAC TTGTGCGATC TCTGATGGCT GTCCTGCAGA AATCTATGAG
101 TTTTCCCTT ATGGGGACTT TGGCCGCCAG CTGCCTGCTT CTCATTGCC
151 TGTGGGCCCA GGAGGCAAAT GCGCTGCCCG TCAACACCCG GTGCAAGCTT
201 GAGGTGTCCA ACTTCCAGCA GCCATACATC GTCAACCGCA CCTTTATGCT
251 GGCCAAGGAG GCCAGCCTTG CAGATAACAA CACAGATGTC CGGCTCATCG
301 GGGAGAACT GTTCCGAGGA GTCAGTGCTA AGGATCAGTG CTACCTGATG
351 AAGCAGGTGC TCAACTTCAC CCTGGAAGAC GTTCTGCTCC CCCAGTCAGA
401 CAGGTTCCAG CCCTACATGC AGGAGGTGGT GCCTTTCCTG ACCAAACTCA
451 GCAATCAGCT CAGCTCCTGT CACATCAGCG GTGACGACCA GAACATCCAG
501 AAGAATGTCA GAAGGCTGAA GGAGACAGTG AAAAAAGCTTG GAGAGAGTGG
551 AGAGATCAAG GCGATTGGGG AACTGGACCT GCTGTTTATG TCTCTGAGAA
601 ATGCTTGCGT CTGAGCGAGA AGAAGCTAGA AAACGAAGAA CTGCTCCTTC
651 CTGCCTTCTA AAAAGAACAA TAAGATCCCT GAATGGACTT TTTTACTAAA
701 GGAAAGTGAG AAGCTAACGT CCATCATTAT TAGAAGATTT CACATGAAAC
751 CTGGCTCAGT TGAAAAAGAA AATAGTGTC AATTGTCCAT GAGACCAGAG
801 GTAGACTTGA TAACCACAAA GATTCATTGA CAATATTTTA TTGTCACTGA
851 TGATACAACA GAAAAATAAT GTACTTTAAA AAATTGTTTG AAAGGAGGTT
901 ACCTCTCATT CCTTTAGAAA AAAAGCTTAT GTAACCTCAT TTCCATAACC
951 AATATTTTAT ATATGTAAGT TTATTTATTA TAAGTATACA TTTTATTTAT
1001 GTCAGTTTAT TAATATGGAT TTATTTATAG AAACATTATC TGCTATTGAT
1051 ATTTAGTATA AGGCAAATAA TATTTATGAC AATAACTATG GAAACAAGAT
1101 ATCTTAGGCT TTAATAAACA CATGGATATC ATAAAAAAA AAAAAAAA
1151 AAAAAAAGC GGCCGC
    
```

Figura 1