

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 479**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2007** **E 07873840 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015** **EP 2035445**

54 Título: **Polinucleótidos que codifican nuevas variantes de PCSK9**

30 Prioridad:

30.06.2006 US 818234 P

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

31.08.2015

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**MINTIER, GABRIEL A.;
CHEN, JIAN;
FEDER, JOHN N.;
PARKER, REX A. y
MIAO, BOWMAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 479 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

Polinucleótidos que codifican nuevas variantes de PCSK9

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevos polinucleótidos que codifican polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c, fragmentos y homólogos de los mismos. También se proporcionan vectores, células hospedadoras, anticuerpos, y métodos recombinantes y sintéticos para producir dichos polipéptidos. La invención también se refiere al uso diagnóstico y terapéutico de estos nuevos polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c en el diagnóstico, tratamiento, y/o prevención de varias enfermedades y/o trastornos relacionados con estos polipéptidos.

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias responsable de la insuficiencia cardíaca coronaria (ICC), subyacente a la mayoría de las muertes en países industrializados (Lusis, 2000). Actualmente se han determinado varios factores de riesgo para la ICC: dislipidemias, hipertensión, diabetes, tabaquismo, mala alimentación, inactividad y estrés. Las dislipidemias más relevantes y comunes clínicamente están caracterizadas por un aumento en las beta-lipoproteínas (partículas de VLDL y LDL) con hipercolesterolemia en ausencia o presencia de hipertrigliceridemia (Fredrickson et al., 1967). Un alivio aislado del colesterol de LDL es uno de los factores de riesgo más comunes para la CII. Los estudios en gemelos (Austin et al., 1987) y los datos familiares (Perusse, 1989; Rice et al., 1991) han demostrado la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad, particularmente cuando sus complicaciones aparecen a una edad temprana. Se han identificado formas mendelianas de hipercolesterolemia: primeramente la forma dominante autosómica (ADH) (Khachadurian, 1964) y posteriormente la forma recesiva autosómica (ARH), inicialmente descrita como "hiperlipoproteinemia de tipo II seudohomocigótica" (Morganroth et al., 1967).

La ADH es un trastorno genético heterogéneo. Su forma más frecuente y arquetípica es la hipercolesterolemia familiar (HF) con una frecuencia de 1 por cada 500 para los heterocigotos y 1 por millón para homocigotos (Goldstein et al., 1973). La enfermedad es codominante, viéndose afectados los homocigotos antes y de manera más grave que los heterocigotos. La HF está causada por mutaciones en el gen que codifica el receptor de LDL (Goldstein y Brown, 1978) (LDLR en 19p13.1-p13.3) (MIN 143890). Esta está caracterizada por un aumento selectivo en los niveles de colesterol de LDL en plasma, dando lugar a xantomas de tendones y piel, arco corneano y depósitos cardiovasculares que dan lugar a aterosclerosis progresiva y prematura, ICC y mortalidad (sucediendo antes de los 55 años). La segunda forma de ADN es la apo B-100 familiar defectuosa (FDB) causada por mutaciones en el gen de apolipoproteína B (APOB en 2p23-p24), que codifica el ligando del receptor de LDL (Inneraty et al., 1987) (MIN 144010). Se ha comunicado la existencia de un mayor nivel de heterogeneidad genética en la ADH (Sain-Jore et al., 2000) y se ha detectado y mapeado la implicación de un tercer locus denominado HCHOLA3 (anteriormente FH3) en 1p34.1-p32 en una familia francesa (Varret et al., 1999) (MIM 603776). Estos resultados se confirmaron por Hunt et al. en un clan de Utah (Hunt et al., 2000).

PCSK9, para proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (también citada como HCHOLA3, NARC-1, o FH3) es una proteasa que pertenece a la subfamilia de proteinasa K de la familia secretora de subtilasa (Naureckiene et al., Arch. of Biochem. And Biophys., 420:55-57 (2003)). Se ha demostrado que PCSK9 tiene un papel en la homeostasis del colesterol regulando la secreción del receptor de apolipoproteína. También puede tener un papel en la diferenciación de neuronas corticales cerebrales (Seidah et al., PNAS 100(3):928-933 (2003)).

El gen de PCSK9 de tipo silvestre contiene 12 exones. La proteína traducida contiene un péptido de señal en el extremo NH2, y en células y tejidos se encuentra una forma (precursora) de zimógeno de aproximadamente 74 kDa de la proteína de longitud completa en el retículo endoplásmico. Durante el procesamiento inicial en la célula, el péptido de prodominio de aproximadamente 14 kDa se escinde autocatalíticamente para producir una proteína madura de aproximadamente 60 kDa que contiene el dominio catalítico y un dominio C-terminal, a menudo citado como dominio rico en histidina (CHRD) (Figura 1). Esta forma de aproximadamente 60 kDa de PCSK9 se secreta por células hepáticas. La forma secretada de PCSK9 parece ser la especie fisiológicamente Activa, aunque no se ha descartado un papel funcional intracelular de la forma de aproximadamente 60 kDa.

Se conocen varias formas mutantes de PCSK9, incluyendo S127R, N157K, F216L, R218S, y D374Y, estando S127R, F216L, y D374Y relacionadas con la hipercolesterolemia dominante autosómica (ADH). Benjannet et al. (J. Biol. Chem., 279(47):48865-48875 (2004)) demostraron que las mutaciones S127R y D374Y dan como resultado una disminución significativa en el nivel de pro-PCSK9 procesada en el RE para formar el zimógeno activo secretado. Por consiguiente, se cree que PCSK9 aumenta la velocidad de renovación del receptor de LDL causando la inhibición de la eliminación de LDL (Maxwell et al., PNAS, 102(6):2069-2074 (2005); Benjannet et al., y Lalanne et al); mientras que las mutaciones dominantes autosómicas de PCSK9 dan como resultado niveles aumentados de LDLR, eliminación aumentada de LDL circulante, y una disminución correspondiente en los niveles de colesterol en plasma (Rashid et al., PNAS, 102(15):5374-5379 (2005)).

Lalanne et al. demostraron que el catabolismo de LDL estaba alterado y la síntesis de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B estaba potenciada en dos pacientes portadores de mutaciones S127R en PCSK9 (J. Lipid Research, 46:1312-1319 (2005)). Sun et al. también proporcionaron pruebas de que las formas mutantes de PCSK9 también son la causa de una hipercolesterolemia dominante inusualmente grave como consecuencia de su efecto 5 aumentador de la secreción de apolipoproteína B (Sun et al., Hum. Mol. Genet., 14(9):1161-1169 (2005)). Estos resultados fueron coherentes con resultados anteriores que demostraron que la sobreexpresión mediada por adenovirus de PCSK9 en ratones da como resultado hipercolesterolemia grave debido a disminuciones drásticas en la cantidad de receptor de LDL; Dubuc et al., Thromb. Vasc. Biol., 24:1454-1459 (2004), además de con resultados que demuestran que las formas mutantes de PCSK9 también reducen el nivel de receptor de LDL (Park et al., J. Biol. 10 Chem., 279:50630-50638 (2004)). La sobreexpresión de PCSK9 en líneas celulares, incluyendo células derivadas del hígado, y en hígados de ratones *in vivo*, da como resultado una disminución pronunciada en los niveles de proteína LDLR y en actividad funcional de LDLR sin cambios a nivel de ARNm de LDLR (Maxwell K. N., Breslow J. L., Proc. Nat. Amer. Sci., 101:7100-7105 (2004)). Benjannet S. et al., J. Bio. Chem. 279: 48865-48875 (2004)).

Usando los ejemplos anteriores, queda claro que la disponibilidad de nuevas formas de PCSK9 proporciona una oportunidad para la identificación de agonistas de PCSK9, así como para la identificación de inhibidores de PCSK9. Todos los cuales podrían ser terapéuticamente útiles en diferentes circunstancias.

La presente invención también se refiere a vectores recombinantes, que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, y a células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a métodos para producir dichos vectores y células hospedadoras, además de su uso en la producción de polipéptidos o péptidos de PCSK9b y PCSK9c usando técnicas recombinantes. Se proporcionan métodos sintéticos para producir los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención. También se proporcionan métodos diagnósticos para detectar enfermedades, trastornos, y/o afecciones relacionadas con los polipéptidos y polinucleótidos de PCSK9b y PCSK9c, y 25 usos de los polipéptidos en métodos terapéuticos para tratar dichas enfermedades, trastornos, y/o afecciones.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que comprenden, o como alternativa consisten 30 en, un polinucleótido que codifica la proteína PCSK9b que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las Figuras 1A-C (SEC ID N°: 2), respectivamente, o la secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc, PCSK9b (también citado como PCSK9-b), depositado como Número de Depósito de la ATCC® PTA-7622 el 10 de mayo de 2006.

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que comprenden, o como alternativa consisten 35 en, un polinucleótido que codifica la proteína PCSK9c que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las Figuras 1A-D (SEC ID N°: 4), respectivamente, o la secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc, PCSK9c (también citado como PCSK9-c), depositado como Número de Depósito de la ATCC® PTA-7622 el 10 de mayo de 2006.

La presente invención también se refiere a vectores recombinantes, que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, y a células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a métodos para producir dichos vectores y células hospedadoras, además de su uso en la producción de polipéptidos o 40 péptidos de PCSK9b o PCSK9c usando técnicas recombinantes. Se proporcionan métodos sintéticos para producir los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención. También se proporcionan métodos diagnósticos para detectar enfermedades, trastornos, y/o afecciones relacionadas con los polipéptidos y polinucleótidos de PCSK9b o PCSK9c, y 45 usos del polipéptido en métodos terapéuticos para tratar dichas enfermedades, trastornos, y/o afecciones.

La presente invención proporciona además un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia de 50 aminoácidos codificada por un polinucleótido descrito en el presente documento.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un fragmento polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, o un fragmento polipeptídico codificado por la secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede 55 hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un dominio polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o a un dominio polipeptídico codificado por la secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede 60 hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un epítipo polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o a un epítipo polipeptídico codificado por la secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede 65 hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

La invención se refiere además a un polinucleótido que codifica un polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o a la 65 secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, que tiene actividad biológica.

La invención se refiere además a un polinucleótido que es una variante de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

La invención se refiere además a un polinucleótido que es una variante alélica de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

- 5 Además, se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica un homólogo de especie de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

La invención se refiere además a un polinucleótido que representa la secuencia complementaria (antisentido) de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 4.

- 10 La invención se refiere además a un polinucleótido capaz de hibridar en condiciones rigurosas con uno cualquiera de los polinucleótidos especificados en el presente documento, en el que dicho polinucleótido no hibrida en condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica solo de restos de A o solo de restos de T.

- 15 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico aislada de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, en la que el fragmento polinucleotídico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteinasa de subtilisina proteasa K.

- 20 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico aislada de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, en la que el fragmento polinucleotídico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia identificada como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o al polipéptido codificado por la secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

- 25 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico aislada de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, en la que el fragmento polinucleotídico comprende la secuencia nucleotídica completa de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o la secuencia de ADNc incluida en el clon depositado, que puede hibridarse con SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

- 30 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico aislada de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, en la que la secuencia nucleotídica comprende eliminaciones de nucleótidos secuenciales desde el extremo C-terminal o el extremo N-terminal.

- 35 La invención se refiere además a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o la secuencia codificada incluida en el clon depositado.

Además, en el presente documento se describe un fragmento polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o la secuencia codificada incluida en el clon depositado, que tiene actividad biológica.

- 40 Además, en el presente documento se describe un dominio polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o la secuencia codificada incluida en el clon depositado.

Además, en el presente documento se describe un epítipo polipeptídico de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o la secuencia codificada incluida en el clon depositado.

- 45 La invención se refiere además a una proteína de longitud completa de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o a la secuencia codificada incluida en el clon depositado.

Además, en el presente documento se describe una variante de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

- 50 Además, en el presente documento se describe una variante alélica de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

Además, en el presente documento se describe un homólogo de especie de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

- 55 Además, en el presente documento se describe el polipéptido aislado de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, en el que la proteína de longitud completa comprende eliminaciones secuenciales de aminoácidos desde el extremo C-terminal o el extremo N-terminal.

- 60 La invención se refiere además a un anticuerpo aislado que se une específicamente al polipéptido aislado de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

La invención se refiere además al uso del polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o al polinucleótido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, que comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polipéptido o de dicho polinucleótido.

65

La invención se refiere además a un método para diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica en un sujeto que comprende las etapas de: (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación en el polinucleótido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; y (b) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica basándose en la presencia o ausencia de dicha mutación.

La invención se refiere además a un método para diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica en un sujeto que comprende las etapas de: (a) determinar la presencia o el grado de expresión del polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en una muestra biológica; y (b) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica basándose en la presencia o el grado de expresión del polipéptido.

Además, se describe en el presente documento un método para identificar un compañero de unión para el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto el polipéptido de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 con un compañero de unión; y (b) determinar si el compañero de unión afecta a una actividad del polipéptido.

La invención se refiere además a un gen que se corresponde con la secuencia de ADNc de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

Además, en el presente documentos e describe un método para identificar una actividad en un ensayo biológico, en el que el método comprende las etapas de: (a) expresar SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 en una célula; (b) aislar el sobrenadante; (c) detectar una actividad en un ensayo biológico; y (d) identificar la proteína en el sobrenadante que tiene la actividad.

Además, en el presente documento se describe un proceso para preparar secuencias polinucleotídicas que codifican productos génicos que tienen actividad alterada seleccionada del grupo que consiste en actividad de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, comprendiendo el proceso las etapas de: (a) reordenar una secuencia nucleotídica de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; (b) expresar las secuencias nucleotídicas reordenadas resultantes; y (c) seleccionar para actividad alterada seleccionada del grupo que consiste en actividad de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en comparación con la actividad seleccionada a partir del grupo que consiste en actividad de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 del producto génico de dicha secuencia nucleotídica no modificada.

Además, en el presente documento se describe una secuencia nucleotídica reordenada producida mediante un proceso de reordenamiento, en el que dicha molécula de ADN reordenada codifica un producto génico que tiene tolerancia potenciada a un inhibidor de una cualquiera de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en actividad de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

La invención se refiere además al polipéptido proporcionado como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, además de a su ácido nucleico codificante, para su uso en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, en el que la afección médica es un trastorno reproductivo.

La invención se refiere además al polipéptido proporcionado como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, además de a su ácido nucleico codificante, para su uso en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, en el que la afección médica es un trastorno relacionado con la señalización y/o actividad aberrante de PCSK9.

La invención se refiere además al polipéptido proporcionado como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, además de a su ácido nucleico codificante, para su uso en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, en el que la afección médica es un trastorno cardiovascular, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia dominante autosómica; trastornos asociados con la función aberrante del receptor de LDL; trastornos asociados con apolipoproteína B; trastornos asociados con la hipercolesterolemia recesiva autosómica; trastornos asociados con el colesterol elevado; trastornos asociados con LDL elevadas; trastornos asociados con la velocidad de eliminación reducida de las LDL en el hígado; trastornos asociados con la producción elevada de apoB de LDL; hipercolesterolemia familiar; trastornos del metabolismo de lípidos; LDL elevadas; depósitos de colesterol; xantomas de tendón; ateroma; arteriosclerosis prematura; enfermedad coronaria; apolipoproteína B defectuosa familiar; hipersensibilidad a estatinas; trastornos asociados con la degradación acelerada de LDLR, trastornos de la diferenciación neural.

La invención se refiere además al polipéptido proporcionado como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, además de a su ácido nucleico codificante, para su uso en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, en el que la afección médica es un trastorno metabólico.

La invención se refiere además al polipéptido proporcionado como SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, además de a su ácido nucleico codificante, para su uso en un método para prevenir, tratar, o mejorar una afección médica, en el que la afección médica es un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en: dislipidemia, dislipidemia diabética, dislipidemia mixta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus de tipo II, diabetes de tipo I, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, obesidad, anorexia nerviosa.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto que modula la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, que comprende las etapas de: (a) combinar a un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y (b) medir un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto que modula la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar a un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y (b) medir un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c, en el que dicho método incluye opcionalmente la adición de un sustrato adecuado de PCSK9 bien antes, durante, o después de la adición de dicho compuesto modulador candidato.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto antagonista que modula la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tienen la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en presencia de un sustrato de PCSK9 adecuado; y (b) identificar compuestos antagonistas midiendo un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c, en el que dicho compuesto antagonista identificado disminuye la actividad de proteinasa de PCSK9b y/o PCSK9c.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto agonista que modula la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tienen la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en presencia de un sustrato de PCSK9 adecuado; y (b) identificar compuestos agonistas midiendo un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c, en el que dicho compuesto agonista identificado aumenta la actividad de proteinasa de PCSK9b y/o PCSK9c.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto que modula la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar a un compuesto modulador candidato una célula hospedadora que expresa PCSK9b y/o PCSK9c que tiene la secuencia tal como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y (b) medir un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c expresadas.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto antagonista que modula la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tienen la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en presencia de un sustrato de PCSK9 adecuado; y (b) identificar compuestos antagonistas midiendo un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9, en el que dicho compuesto antagonista identificado disminuye la actividad de proteinasa de PCSK9.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto agonista que modula la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar un compuesto modulador candidato con PCSK9b y/o PCSK9c que tienen la secuencia expuesta en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 en presencia de un sustrato de PCSK9 adecuado; y (b) identificar compuestos agonistas midiendo un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9, en el que dicho compuesto agonista identificado aumenta la actividad de proteinasa de PCSK9.

Además, en el presente documento se describe un método para identificar un compuesto que modula la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre, comprendiendo el método las etapas de: (a) combinar a un compuesto modulador candidato una célula hospedadora que expresa PCSK9b y/o PCSK9c que tiene la secuencia tal como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4; y (b) medir un efecto del compuesto modulador candidato en la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c expresadas.

Además, en el presente documento se describe un método para explorar un compuesto que es capaz de modular la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una célula hospedadora descrita en el presente documento; (b) determinar la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c en ausencia de un compuesto modulador; (c) poner en contacto la célula con el compuesto modulador; y (d) determinar la actividad biológica de PCSK9b y/o PCSK9c en presencia del compuesto modulador; en el que una diferencia entre la actividad de PCSK9b y/o PCSK9c en presencia del compuesto modulador y en ausencia del compuesto modulador indica un efecto modulador del compuesto.

Además, en el presente documento se describe un método para explorar un compuesto que es capaz de modular la actividad biológica de PCSK9, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una célula hospedadora que comprende PCSK9b y/o PCSK9c; (b) determinar la actividad biológica de PCSK9 en ausencia de un compuesto modulador; (c) poner en contacto la célula con el compuesto modulador; y (d) determinar la actividad biológica de PCSK9 en presencia del compuesto modulador; en el que una diferencia entre la actividad de PCSK9 en presencia del compuesto modulador y en ausencia del compuesto modulador indica un efecto modulador del compuesto.

Además, en el presente documento se describe un truncamiento N-terminal de PCSK9 (SEC ID N°: 5), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado la eliminación de una cantidad cualquiera entre aproximadamente 1 y aproximadamente 218 aminoácidos desde el extremo N-terminal de SEC ID N°: 5, y en el que el truncamiento N-terminal da como resultado actividad biológica de PCSK9 elevada, incluyendo, pero sin limitación, niveles de proteína LDLR disminuidos, y/o captación de LDL por LDLR disminuida.

Además, en el presente documento se describe un truncamiento N-terminal de PCSK9 (SEC ID N°: 5), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado la eliminación de una cantidad cualquiera entre aproximadamente 1 y aproximadamente 218 aminoácidos desde el extremo N-terminal de SEC ID N°: 5, incluyendo, pero sin limitación, niveles de proteína LDLR disminuidos, y/o captación de LDL por LDLR disminuida, y en el que dicha actividad biológica de PCSK9 elevada es al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 100 %, o más que la actividad biológica elevada de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 1, 2, 3, 4, o un 5 por ciento más o menos de la cantidad citada. Como alternativa, dicha actividad biológica elevada de PCSK9 puede ser al menos aproximadamente 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x más que la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 0,1x, 0,2x, 0,3x, 0,4x, 0,5x, 0,6x, 0,7x, 0,8x, o 0,9x más o menos de la cantidad citada.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "modular" o "modula" se refieren a un aumento o una disminución en la cantidad, calidad o efecto de una actividad particular, ADN, ARN, o proteína de PCSK9b y/o PCSK9c.

Breve descripción de las figuras/dibujos

El archivo de esta patente contiene al menos una figura ejecutada en color. Se proporcionarán copias de esta patente con Figura o Figuras a color por la Oficina de Patentes y Marcas tras la petición y pago de la tasa necesaria.

Las Figuras 1A-C muestran la secuencia polinucleotídica (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 2) de la nueva variante de PCSK9, PCSK9b de la presente invención. Se usa la abreviatura convencional de una letra para aminoácidos para ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida. La secuencia polinucleotídica contiene una secuencia de 3175 nucleótidos (SEC ID N°: 1), que codifica un polipéptido de 315 aminoácidos (SEC ID N°: 2). Un análisis del polipéptido PCSK9b determinó que comprendía las siguientes características: un dominio catalítico localizado desde aproximadamente el aminoácido 10 hasta aproximadamente el aminoácido 256 de SEC ID N°: 2 indicado en letra cursiva, residendo la tríada catalítica canónica en los aminoácidos D17, H57, y S217 de SEC ID N°: 2, indicado con subrayado doble; y seis restos conservados de cisteína localizados en los aminoácidos C54, C86, C132, C154, C189, y C206 de SEC ID N°: 2, indicados en negrita, prediciéndose que los enlaces disulfuro se formarán entre los siguientes partes de cisteínas: C54 y C86, y C154 y C189; y un dominio predicho de unión a Ca^{2+} que se predice que se formará entre los restos D191, P162, y V164 de SEC ID N°: 2, indicados con un asterisco (*) por debajo del resto de aminoácido.

Las Figuras 2A-D muestran la secuencia polinucleotídica (SEC ID N°: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 4) de la nueva variante de PCSK9, PCSK9c de la presente invención. Se usa la abreviatura convencional de una letra para aminoácidos para ilustrar la secuencia de aminoácidos deducida. La secuencia polinucleotídica contiene una secuencia de 3756 nucleótidos (SEC ID N°: 3), que codifica un polipéptido de 523 aminoácidos (SEC ID N°: 4). Un análisis del polipéptido PCSK9b determinó que comprendía las siguientes características: un dominio catalítico localizado desde aproximadamente el aminoácido 10 hasta aproximadamente el aminoácido 256 de SEC ID N°: 4 indicado en letra cursiva, residendo la tríada catalítica canónica en los aminoácidos D17, H57, y S217 de SEC ID N°: 4, indicado con subrayado doble; y seis restos conservados de cisteína localizados en los aminoácidos C54, C86, C132, C154, C189, y C206 de SEC ID N°: 4, indicados en negrita, prediciéndose que los enlaces disulfuro se formarán entre los siguientes partes de cisteínas: C54 y C86, y C154 y C189; y un dominio predicho de unión a Ca^{2+} que se predice que se formará entre los restos D191, P162, y V164 de SEC ID N°: 4, indicados con un asterisco (*) por debajo del resto de aminoácido.

Las Figuras 3A-C muestran las regiones de identidad y similitud entre las secuencias de los polipéptidos codificados PCSK9b y PCSK9c de la presente invención con la secuencia de la proteína PCSK9 humana de tipo silvestre (PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|NM_174936; SEC ID N°: 5); así como la secuencia de una variante conocida del polipéptido de PCSK9 de tipo silvestre (variante de PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|AK124635; SEC ID N°: 6). El alineamiento se llevó a cabo usando el algoritmo CLUSTALW usando parámetros por defecto, tal como se describe en el presente documento (paquete de programas VECTOR NTI®). Los aminoácidos con sombreado oscuro representan regiones de identidad coincidente. Los aminoácidos con sombreado claro representan regiones de similitud coincidente. Los puntos ("•") entre restos indican regiones con huecos de no identidad para los polipéptidos alineados. La localización de la tríada de aminoácidos catalíticos conservados se indica mediante un asterisco (*).

La Figura 4 muestra una tabla que ilustra la identidad porcentual y la similitud porcentual entre los polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c de la presente invención con PCSK9 y su variante. Tal como se muestra, el dominio catalítico tanto de PCSK9b como de PCSK9c comparte un 100 % de identidad con el dominio catalítico de PCSK9. Los valores de

identidad porcentual y similitud porcentual se determinaron usando el algoritmo CLUSTALW usando parámetros por defecto, tal como se describe en el presente documento (paquete de programas VECTOR NTI®).

La Figura 5 proporciona un diagrama esquemático de las variantes de PCSK9b y PCSK9c en comparación con PCSK9 de tipo silvestre. Tal como se muestra, las variantes tanto PCSK9b como PCSK9c comienzan a partir del intrón original 3. PCSK9b tiene un nuevo sitio de corte y empalme en el exón 9 que produce un desplazamiento de marco y un truncamiento temprano del dominio C-terminal como consecuencia de un codon de parada dentro del marco.

La Figura 6 muestra un perfil de expresión de los polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c humanos. La figura ilustra el nivel de expresión relativa de PCSK9b y PCSK9c entre varias fuentes tisulares de ARNm. La identidad de cada tejido se proporciona en la Tabla IV en el Ejemplo 3. Tal como se muestra, los polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c se expresaron predominantemente en el cerebelo del cerebro y en el hígado, a niveles aproximadamente 3500 veces mayores que en el tejido con menor expresión. Se observó una expresión significativa en el pulmón, en los vasos sanguíneos pulmonares, y en los tejidos del tracto GI. Los datos de expresión se obtuvieron midiendo los niveles de estado estacionario de ARNm de PCSK9b y PCSK9c mediante PCR cuantitativa usando el par de cebadores de PCR proporcionados como SEC ID N°: 10 y 11, y sonda TAQMAN® (SEC ID N°: 12) tal como se describe en el Ejemplo 3 en el presente documento.

La Figura 7 muestra los resultados de la sobreexpresión de variantes de PCSK9b y PCSK9c en células HEK y CHO. El Panel "A" muestra el nivel de expresión observado de PCSK9, mientras que el Panel "B" muestra el nivel de expresión observado de LDLR, después de que las células HEK se transfectasen transitoriamente con PCSK9 de tipo silvestre (TS), con mutante D374Y de PCSK9, y con plásmidos de PCSK9b y PCSK9c. Los plásmidos de variante de PCSK9b se representan como "N° 3114" "N° 3115", mientras que los plásmidos de variante de PCSK9c se representan como "N° 3116" y "N° 3117". Los datos de expresión se obtuvieron midiendo los niveles de estado estacionario de ARNm de PCSK9b y PCSK9c mediante PCR cuantitativa tal como se describe en el Ejemplo 4 en el presente documento.

La Figura 8 muestra los resultados de los análisis de transferencia de Western tanto de lisados celulares como de medio condicionado de células HEK y CHO transfectadas transitoriamente con variantes de PCSK9b y PCSK9c usando anticuerpo específico para PCSK9. El Panel "A" muestra la transferencia de Western de PCSK9 en lisados celulares de células HEK transfectadas con PCSK9 usando anticuerpo para PCSK9, mientras que el Panel "B" muestra la transferencia de Western de PCSK9 de medio condicionado de células CHO transfectadas transitoriamente con variantes de PCSK9. Los plásmidos variantes de PCSK9b se representan como "N° 3114" "N° 3115", mientras que los plásmidos de variante de PCSK9c se representan como "N° 3116" y "N° 3117". PCSK9 de tipo silvestre se representa como "TS", mientras que el mutante D374Y de PCSK9 se representa como "D374Y". Tal como se muestra, ambas proteínas variantes PCSK9b y PCSK9c se secretaron por las células transfectadas, tal como se demuestra por su detección en medio condicionado a pesar de que ambas variantes carecían de un péptido de señal. Las transferencias de Western se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4 en el presente documento.

La Figura 9 muestra los resultados del diseño para evaluar si las variantes de PCSK9b y PCSK9c son capaces de disminuir la unión de LDL a LDLR. El Panel A muestra los resultados de la captación de Dil-LDL en células HepG2 transfectadas con PCSK9b y PCSK9c, mientras que el Panel B muestra los resultados de la transferencia de Western en lisados celulares de células CHO transfectadas con PCSK9b o PCSK9c. Se usaron anticuerpos tanto de PCSK9 como de LDLR para las transferencias de Western. Los plásmidos de variante de PCSK9b se representan como "3114" "3115"; los plásmidos de variante de PCSK9c se representan como "3116" y "3117"; PCSK9 de tipo silvestre se representa como "TS"; el mutante D374Y de PCSK9 se representa como "D3"; el vector solo se representa como "vec", y las células incubadas en medio que contiene FBS al 10 % se representan como "FBS", mientras que las células incubadas en medio de crecimiento deficiente en lipoproteína al 5 % se representan como "LPDS". Tal como se muestra en el panel "A", la transfección transitoria de células HepG2 con ambas proteínas variantes de PCSK9b y PCSK9c dio como resultado un nivel disminuido de captación de Dil-LDL que sobrepasaba al nivel observado para PCSK9 de tipo silvestre. Tal como se muestra en el panel "B", la transfección transitoria de células CHO con la variante PCSK9c dio como resultado una disminución en el nivel de proteína LDLR, mientras que la transfección transitoria con la variante b no pareció afectar al nivel de proteína LDLR en estas condiciones. El marcador de anticuerpo anti-PCSK9 se muestra en color verde, mientras que el marcador de anticuerpo anti-LDLR se muestra en color rojo. Los ensayos de captación de Dil-LDL y las transferencias de Western se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 4 en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente en referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención y los Ejemplos incluidos en el presente documento.

La invención proporciona nuevas secuencias humanas que codifican variantes de PCSK9 de las mismas, PCSK9b y PCSK9c, además de formas truncadas en N-terminal de PCSK9. PCSK9 se ha implicado en la incidencia de una serie de enfermedades y/o trastornos, incluyendo hipercolesterolemia, sus trastornos cardiovasculares relacionados, además de con otros trastornos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.

En la presente invención, "aislado" se refiere a un material retirado de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es de origen natural), y por lo tanto se altera "por la acción del hombre" respecto de su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o composición de materia, o podría estar contenido en una célula, y seguir estando "aislado" ya que ese vector, composición de materia, o célula particular no son el ambiente original del polinucleótido. El término "aislado" no se refiere a bibliotecas genómicas o de ADNc, preparaciones de ARNm o total de células completas, preparaciones de ADN genómico (incluyendo aquellas separadas mediante electroforesis y sobre manchas), preparaciones de ADN genómico cortado de células completas u otras composiciones donde la técnica no demuestra características distintivas de los polinucleótidos/secuencias de la presente invención.

En realizaciones específicas, los polinucleótidos de la invención son aproximadamente de al menos 15, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 125, al menos 500, al menos 837, al menos 903, al menos 1000, o al menos 1554 nucleótidos contiguos pero son menores o iguales a 300 kb, 200 kb, 100 kb, 50 kb, 15 kb, 10 kb, 7,5 kb, 5 kb, 2,5 kb, 2,0 kb, o 1 kb de longitud. En este contexto, aproximadamente significa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos más largo o más corto en el extremo 5' o 3', o ambos. En una realización adicional, los polinucleótidos de la invención comprenden una porción de las secuencias codificantes, tal como se divulgan en el presente documento, pero que no comprenden la totalidad o una porción de cualquier intrón. En otra realización, los polinucleótidos que comprenden secuencias codificantes no contienen secuencias codificantes de un gen genómico flanqueante (es decir, 5' o 3' respecto del gen de interés en el genoma). En otras realizaciones, los polinucleótidos de la invención no contienen una secuencia codificante de más de 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 gen(es) genómico(s) flanqueante(s).

Tal como se usa en el presente documento, un "polinucleótido" se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3, o el ADNc contenido en el clon depositado en la ATCC®. Por ejemplo, el polinucleótido puede contener la secuencia nucleotídica de la secuencia de ADNc de longitud completa, incluyendo las secuencias 5' y 3' no traducidas, la región codificante, con o sin una secuencia de señal, la región codificante de la proteína secretada, así como fragmentos, epítomos, dominios, y variantes de la secuencia de ácido nucleico. Además, tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos traducida generada a partir del polinucleótido tal como se ha descrito ampliamente.

En la presente invención, la secuencia de longitud completa identificada como SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 se generó solapando secuencias contenidas en uno o más clones (análisis de cóntigo). Los clones representativos que contienen la totalidad de la secuencia para SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3 se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés, American Type Culture Collection, "ATCC®"). Tal como se muestra en la Tabla 1, cada clon se identifica mediante una ID (identificador) de clon de ADNc y el número de depósito en la ATCC®. La ATCC® está ubicada en el 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. El depósito en la ATCC® se efectuó de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines del Procedimiento de Patentes. El clon depositado para PCSK9b está insertado en el vector pSport2 (Invitrogen). El clon depositado para PCSK9c está insertado en el vector pSport1 (Invitrogen).

A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias nucleotídicas determinadas secuenciando una molécula de ADN se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado (tal como el Modelo 373, preferentemente el Modelo 3700, de Applied Biosystems, Inc.), y todas las secuencias de aminoácidos de polipéptidos codificados por moléculas de ADN determinadas en el presente documento se predijeron mediante la traducción de una secuencia de ADN determinada anteriormente. Por lo tanto, tal como se conoce en la materia para cualquier secuencia de ADN determinada mediante esta estrategia automatizada, cualquier secuencia nucleotídica determinada en el presente documento puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas mediante automatización son normalmente al menos aproximadamente un 90 % idénticas, más normalmente al menos aproximadamente un 95 % hasta al menos aproximadamente un 99,9 % idénticas a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse de manera más precisa mediante otras estrategias, incluyendo métodos de secuenciación manual de ADN bien conocidos en la técnica. Como también se sabe en la técnica, una sola inserción o delección en una secuencia de nucleótidos determinada, comparada con la secuencia real, provocará un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia nucleotídica, de tal forma que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia nucleotídica determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos realmente codificada por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o delección.

Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como la secuencia nucleotídica en las Figuras 1A-C (SEC ID N°: 1), puede obtenerse una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica el polipéptido de PCSK9b usando procedimientos de clonación y exploración convencionales, tales como aquellos para clonar ADNc usando ARNm como material de partida.

Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como la secuencia nucleotídica en las Figuras 2A-D (SEC ID N°: 3), puede obtenerse una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica el polipéptido de PCSK9c usando procedimientos de clonación y exploración convencionales, tales como aquellos para clonar ADNc usando ARNm como material de partida.

Un "polinucleótido" de la presente invención también incluye aquellos polinucleótidos capaces de hibridar, en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, con las secuencias contenidas en SEC ID N°: 1, el complemento de las mismas, o el ADNc en el clon depositado en la ATCC®. Las "condiciones de hibridación rigurosas" se refieren a una incubación durante toda una noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50 %, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido del lavado de los filtros en SSC 0,1x a aproximadamente 65 °C.

También están contempladas moléculas de ácido nucleico que hibridan con los polinucleótidos de la presente invención en condiciones de menor rigurosidad. Los cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de señales se logran principalmente manipulando la concentración de formamida (menores porcentajes de formamida dan como resultado una rigurosidad reducida); condiciones de sal o temperatura. Por ejemplo, las condiciones de menor rigurosidad incluyen una incubación durante toda una noche a 37 °C en una solución que comprende SSPE 6X (SSPE 20X = NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), SDS al 0,5 %, formamida al 30 %, 100 µg/ml de ADN bloqueante de esperma de salmón; seguido de lavados a 50 °C con SSPE 1X, SDS al 0,1 %. Además, para lograr una rigurosidad aún más baja, los lavados efectuados después de la hibridación rigurosa pueden efectuarse a mayores concentraciones de sal (por ejemplo, SSC 5X).

Nótese que pueden efectuarse variaciones en las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos bloqueantes alternativos usados para suprimir el fondo en los experimentos de hibridación. Los reactivos bloqueantes típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas comercialmente disponibles. La inclusión de reactivos bloqueantes específicos puede necesitar la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas de compatibilidad.

Por supuesto, un polinucleótido que hibrida solo con secuencias de poliA+ (tal como cualquier tracto de poliA+ 3' terminal de un ADNc mostrado en el listado de secuencias), o con una serie complementaria de restos de T (o U), no se incluirá en la definición de "polinucleótido" ya que dicho polinucleótido hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contenga una serie de poli (A) en el complemento de la misma (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario generando usando oligo dT como cebador).

El polinucleótido de la presente invención puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar compuestos de ADN mono y bicatenario, ADN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que sea una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, el polinucleótido puede estar compuesto de regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido puede contener también una o más bases modificadas o estructuras de ADN o ARN modificadas por estabilidad o por otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases infrecuentes, tales como inosina. Puede efectuarse una serie de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, un "polinucleótido" abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

El polipéptido de la presente invención puede estar compuesto de ácidos nucleicos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los polipéptidos pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccion, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Dichas modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una gran cantidad de bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden aparecer en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la estructura peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino y carboxilo terminales. Se apreciará que puede estar presente el mismo tipo de modificación en grados iguales o variantes en varios sitios de un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ramificarse, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos postraduccionales naturales o pueden producirse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o un derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN transferente a proteínas, tal como arginilación, y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed. T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter et al., *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

"SEC ID N°: X se refiere a una secuencia polinucleotídica mientras que "SEC ID N°: Y" se refiere a una secuencia polipeptídica, ambas secuencias se identifican mediante un número entero especificado en la Tabla I.

"Un polipéptido que tiene actividad biológica" se refiere a polipéptidos que muestran una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido de la presente invención, incluyendo formas maduras, medida en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso donde exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la del polipéptido, sino sustancialmente similar a la dependencia de la dosis de una actividad dada comparada con el polipéptido de la presente invención (es decir, el polipéptido candidato mostrará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferentemente, preferentemente no más de aproximadamente diez veces menos actividad, y lo más preferentemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación al polipéptido de la presente invención).

El término "organismo", tal como se cita en el presente documento pretende abarcar cualquier organismo citado en el presente documento, aunque preferentemente a organismos eucariotas, más preferentemente a mamíferos, y lo más preferentemente a seres humanos.

La presente invención abarca la identificación de proteínas, ácidos nucleicos, u otras moléculas que se unen a polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención (por ejemplo, en una interacción receptor-ligando). Los polinucleótidos de la presente invención también pueden usarse en ensayos de trampa de interacción (tales como, por ejemplo, el descrito por Ozenberger y Young (Mol. Endocrinol., 9(10):1321-9, (1995); y Ann. N. Y. Acad. Sci., 7; 766:279-81, (1995)).

El polinucleótido y los polipéptidos de la presente invención son útiles como sondas para la identificación y aislamiento de ADNc de longitud completa y/o ADN genómico que corresponde a los nucleótidos de la presente invención, como sondas para hibridar y descubrir nuevas secuencias de ADN relacionadas, como sondas para clonación posicional de esta o una secuencia relacionada, como sonda para "restar" secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de otros polinucleótidos nuevos, como sondas para cuantificar la expresión génica, y como sondas para micromatrices.

Además, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más dominios de membrana.

Asimismo, en el presente documento se describen métodos para refinar adicionalmente la función biológica de los polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente invención.

Específicamente, los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para identificar ortólogos, homólogos, parálogos, variantes, y/o variantes alélicas de la presente invención. También se describen en el presente documento métodos de uso de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención para identificar la región codificante completa de la invención, regiones no codificantes de la invención, secuencias reguladoras de la invención, y formas secretadas, maduras, pro- y repro- de la invención (según sea aplicable).

También se describen en el presente documento métodos para identificar los sitios de glucosilación inherentes en los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y la consiguiente alteración, eliminación y/o adición de dichos sitios para una serie de características deseables que incluyen, pero sin limitación, aumento del plegamiento de proteínas, inhibición de la agregación de proteínas, regulación del tráfico intracelular a orgánulos, aumento de la resistencia a la proteólisis, modulación de la antigenicidad de proteínas, y mediación de la adhesión intercelular.

Además, en el presente documento se describen métodos para evolucionar los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención usando técnicas de evolución molecular en un esfuerzo para crear e identificar nuevas variantes con nuevas características estructurales, funcionales y/o físicas deseadas.

Además, en el presente documento se describen métodos y procedimientos actualmente disponibles para derivar asignaciones funcionales. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, localización de clones en matrices, tecnología de micromatrices, métodos basados en la PCR (por ejemplo, PCR cuantitativa), metodología antisentido, experimentos de *knockout* génico, y otros procedimientos que podrían usar información de secuencia de clones para construir un cebador o un homólogo híbrido.

Polinucleótidos y polipéptidos de la invención

Características del polipéptido codificado por el polinucleótido N°: 1

El polipéptido de este polinucleótido proporcionado como SEC ID N°: 2 (Figuras 1A-C), codificado por la secuencia polinucleotídica de acuerdo con SEC ID N°: 1 (Figuras 1A-C), y/o codificado por el polinucleótido contenido en el clon depositado, PCSK9b (también citado como PCSK9-b), es una variante del polipéptido PCSK9 humano (PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|NM_174936; SEC ID N°: 5). Se proporciona un alineamiento del polipéptido PCSK9b con PCSK9 además de con una variante de PCSK9 conocida (variante de PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®:

gi|AK124635; SEC ID N°: 6) en las Figuras 3A-C. Los valores de identidad y similitud porcentual entre el polipéptido PCSK9b con estos polipéptidos se proporcionan en la Figura 4.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc de PCSK9b en las Figuras 1A-C (SEC ID N°: 1) contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 315 restos de aminoácidos, con un peso molecular deducido de aproximadamente 33,2 kDa. La secuencia de aminoácidos del polipéptido PCSK9b predicho se muestra en las Figuras 1A-C (SEC ID N°: 2).

Se predijo que el polipéptido PCSK9b comprende un dominio catalítico localizado desde aproximadamente el aminoácido 10 hasta aproximadamente el aminoácido 256 de SEC ID N°: 2, residiendo la tríada catalítica canónica en los aminoácidos D17, H57, y S217 de SEC ID N°: 2; y seis restos conservados de cisteína localizados en los aminoácidos C54, C86, C132, C154, C189, y C206 de SEC ID N°: 2, prediciéndose que los enlaces disulfuro se formarán entre los siguientes pares de cisteínas: C54 y C86, y C 154 y C 189; y un dominio predicho de unión a Ca^{2+} que se predice que se formará entre los restos D191, P162, y V164 de SEC ID N°: 2. En este contexto, puede entenderse que el término "aproximadamente" significa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos más allá de los límites N-terminal y/o C-terminal de las localizaciones de aminoácidos anteriormente citadas.

Ya que el polipéptido de PCSK9b retiene la tríada catalítica del polipéptido PCSK9 de tipo silvestre, además de sus cisteínas conservadas, se espera que el polipéptido de PCSK9b retenga al menos parte de la actividad biológica de PCSK9, incluyendo, pero sin limitación, actividad de proteinasa, actividad de convertasa, actividad de proteasa subtilisina-kexina isozima-1/sitio 1, actividad autocatalítica escindiendo PCSK9, PCSK9b, PCSK9c, u otras variantes de PCSK9 entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos Gln-151 y Ser-152; actividad reguladora de la expresión génica dependiente de esterol (Maxwell et al., J Lipid Res. 2003; 44: 2109-2119), actividad reguladora de la expresión génica dependiente de insulina (Shimomura et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 13656-13661), actividad reguladora de la expresión génica dependiente de factor de transcripción LXR (Repa et al., Genes Dev. 2000; 14: 2819-2830); actividad reguladora de proteína receptora de LDL (Maxwell et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 7100-7105); actividad de regulación positiva dependiente de estatinas (Dubuc et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 1454-1459).

Para confirmar que PCSK9b retiene la actividad biológica de PCSK9, se llevaron a cabo ensayos de captación de Dil-LDL y se demostró que PCSK9b tenía actividad de PCSK9. Sorprendentemente, se descubrió que PCSK9b tiene mayor actividad que PCSK9 de tipo silvestre. El ensayo de captación de Dil-LDL es un ensayo funcional normalizado para el receptor de LDLR, y la actividad de PCSK9 actúa reduciendo la actividad de LDLR. Por lo tanto, la captación de Dil-LDL por células puede usarse como un ensayo funcional subrogado para medir la actividad de PCSK9. La expresión transitoria de PCSK9b actuó para disminuir la captación de Dil-LDL en células HepG2, en comparación con el control de vector, lo que indica que PCSK9b es competente para expresar actividad funcional de PCSK9 en LDLR (Fig. 9). En este ensayo, PCSK9b mostró mayor actividad que PCSK9 de tipo silvestre, aunque no tan fuerte como PCSK9c. Por consiguiente, PCSK9b retiene la capacidad de PCSK9 para modular la actividad funcional en LDLR.

Se demostró que PCSK9b tiene aproximadamente un 25 % más de función que PCSK9 de tipo silvestre, tal como se demostró en el ensayo de captación de LDL (véase la Figura 9A). Por consiguiente, la invención se refiere además al truncamiento N-terminal de PCSK9, tal como, por ejemplo, PCSK9c (SEC ID N°: 2), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado una elevación de la actividad biológica de PCSK9, incluyendo, pero sin limitación, niveles disminuidos de proteína LDLR y/o captación disminuida de LDL por LDLR, y en el que dicha actividad biológica de PCSK9 elevada es al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 100 %, o más que la actividad biológica elevada de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 1, 2, 3, 4, o un 5 por ciento más o menos de la cantidad citada. Como alternativa, dicha actividad biológica elevada de PCSK9 puede ser al menos aproximadamente 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x más que la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 0,1x, 0,2x, 0,3x, 0,4x, 0,5x, 0,6x, 0,7x, 0,8x, o 0,9x más o menos de la cantidad citada.

En el presente documento se describe un polinucleótido que comprende un polipéptido que codifica al menos 279 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 2. Además, en el presente documento se describe un polinucleótido que comprende al menos aproximadamente 837 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos más o menos en el los extremos N- o C-terminal, o ambos, o 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos en el extremo 5' o 3' o ambos. Preferentemente, los polipéptidos y/o los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos mantienen actividad biológica.

En el presente documento se describe un polinucleótido que carece del codon de iniciación además de la metionina del polipéptido codificado de PCSK9b resultante. Específicamente, el polinucleótido corresponde a los nucleótidos 253 hasta 1194 de SEC ID N°: 1, y el polipéptido corresponde a los aminoácidos 2 hasta 315 de SEC ID N°: 2. También se describen vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

Tal como se describe en el presente documento, se ha demostrado que las mutaciones de sentido erróneo de PCSK9 de tipo silvestre en las localizaciones de aminoácidos S127R, F216L y D374Y dan como resultado función aberrante de la proteína PCSK9, dando como resultado la incidencia de hipercolesterolemia (Attie, A.D., *Art. Thromb. and Vasc. Biol.*, 2004;24:1337). Por consiguiente, las mismas mutaciones en las posiciones de aminoácidos correspondientes del polipéptido de PCSK9b de la presente invención serían útiles en métodos para diagnosticar a pacientes susceptibles a la aparición de hipercolesterolemia. Cabe destacar que PCSK9b carece de un aminoácido correspondiente para la mutación S127R a causa del corte y empalme alternativo (véase el alineamiento proporcionado en las Figuras 3A-C).

En el presente documento se describe un polinucleótido de SEC ID N°: 2, en el que la serina en la posición de aminoácido 47 se sustituye con una leucina. Asimismo, en el presente documento se describe un polipéptido de SEC ID N°: 2 que carece del codon de iniciación, además de la metionina del polipéptido de PCSK9b codificado resultante, en el que la serina en la posición de aminoácido 47 se sustituye con una leucina. También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. También se describen en el presente documento vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

En el presente documento se describe un polinucleótido de SEC ID N°: 2, en el que el ácido aspártico en la posición de aminoácido 205 se sustituye con una tirosina. Asimismo, en el presente documento se describe un polipéptido de SEC ID N°: 2 que carece del codon de iniciación, además de la metionina del polipéptido de PCSK9b codificado resultante, en el que el ácido aspártico en la posición de aminoácido 205 se sustituye con una tirosina. También se proporcionan polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. También se describen en el presente documento vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

Ya que el polipéptido PCSK9b representa una variante del polipéptido PCSK9 de tipo silvestre (PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|NM-174936; SEC ID N°: 5), se espera que el patrón de expresión de la variante PCSK9b sea el mismo o similar al del polipéptido PCSK9.

Se determinó que el polipéptido PCSK9 de tipo silvestre se expresa predominantemente en el hígado y en el tejido neuronal, y en menor medida en células mesenquimales del riñón y en los epitelios intestinales (Seidah et al., *PNAS* 100(3):928-933 (2003)).

El perfil de expresión diseñado para medir los niveles en estado estacionario de ARNm que codifica los polipéptidos PCSK9b y PCSK9c confirmó que compartían el patrón de expresión predominante hepático y neuronal de PCSK9 de tipo silvestre. Específicamente, PCSK9b y PCSK9c se expresaron predominantemente en el hígado y en el cerebelo a niveles que eran más de 3500 veces el del tejido con la menor expresión (el corazón). PCSK9b y PCSK9c también se expresaron de manera relativamente elevada en el pulmón y su vasculatura asociada. PCSK9b y PCSK9c también se expresaron a lo largo del tracto gastrointestinal (véase la Figura 6). La expresión de PCSK9b y PCSK9c en el cerebelo indica que PCSK9b y PCSK9c pueden funcionar en la diferenciación neuronal.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos: hipercolesterolemia dominante autosómica; trastornos asociados con la función aberrante del receptor de LDL; trastornos asociados con apolipoproteína B; trastornos asociados con la hipercolesterolemia recesiva autosómica; trastornos asociados con el colesterol elevado; trastornos asociados con LDL elevadas; trastornos asociados con la velocidad de eliminación reducida de las LDL en el hígado; trastornos asociados con la producción elevada de apoB de LDL; hipercolesterolemia familiar; trastornos del metabolismo de lípidos; LDL elevadas; depósitos de colesterol; xantomas de tendón; ateroma; arterioesclerosis prematura; enfermedad coronaria; apolipoproteína B defectuosa familiar; hipersensibilidad a estatinas; trastornos asociados con la degradación acelerada de LDLR.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos: trastornos de la diferenciación neuronal.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos cardiovasculares: infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias, cardiomiopatía, aterosclerosis, esclerosis arterial, enfermedad microvascular, embolismo, trombosis, edema pulmonar, palpitación, disnea, angina, hipotensión, síncope, soplo cardíaco, ECG aberrante, cardiomiopatía hipertrófica, el síndrome de Marfan, muerte súbita, síndrome del QT largo, defectos congénitos, infecciones virales cardíacas, enfermedad coronaria valvular, hipertensión, entre otras divulgadas en el presente documento, particularmente en la sección "Trastornos cardiovasculares" y a continuación.

De manera similar, los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b pueden ser útiles para mejorar enfermedades cardiovasculares y síntomas que son el resultado indirecto de varios efectos no cardiovasculares, que incluyen, pero sin limitación, los siguientes, obesidad, tabaquismo, síndrome de Down (asociado con defecto en la almohadilla endocárdica); anomalías óseas de las extremidades superiores (asociadas con una comunicación interauricular en el síndrome de Holt-Oram); distrofias musculares (asociadas con cardiomiopatía); hemocromatosis y enfermedad de

almacenamiento de glucógeno (asociados con la infiltración miocárdica y la cardiomiopatía restrictiva); sordera congénita (asociada con un intervalo QT prolongado y arritmias cardíacas graves); enfermedad de Raynaud (asociada con hipertensión pulmonar primaria y vasoespasmo coronario); trastornos del tejido conectivo, es decir, el síndrome de Marfan, los síndromes de Ehlers-Danlos y de Hurler, y trastornos relacionados del metabolismo de mucopolisacáridos (dilatación aórtica, prolapso de válvula mitral, una serie de anomalías arteriales); acromegalia (hipertensión, aterosclerosis coronaria acelerada, defectos en la conducción, cardiomiopatía); hipertiroidismo (insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular); hipotiroidismo (efusión pericárdica, cardiopatía isquémica); artritis reumatoide (pericarditis, valvulopatía aórtica); esclerodermia (cor pulmonar, fibrosis miocárdica, pericarditis); lupus eritematoso sistémico (valvulitis, miocarditis, pericarditis); sarcoidosis (arritmias, cardiomiopatía); efectos postmenopáusicos, infecciones por clamidia, enfermedad del ovario poliquístico, enfermedad tiroidea, el alcoholismo, la dieta, y dermatitis exfoliativa (insuficiencia cardíaca de alto gasto), por ejemplo.

Además, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, tienen usos que incluyen, directa o indirectamente, tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar las siguientes infecciones cardiovasculares no limitantes: invasión del torrente sanguíneo, bacteriemia, septicemia, infección por *Streptococcus pneumoniae*, infección por estreptococos de grupo a, infección por estreptococos de grupo b, infección por *Enterococcus*, infección por estreptococos de grupo D no enterocócicos, infección por estreptococos de grupo C no enterocócicos, infección por estreptococos de grupo G no enterocócicos, infección por *Streptococcus viridans*, infección por *Staphylococcus aureus*, infección estafilocócica negativa a coagulasa, infección por bacilos Gram-negativos, infección por enterobacterias, infección por *Pseudomonas spp.*, infección por *Acinobacter spp.*, infección por *Flavobacterium meningosepticum*, infección por *Aeromonas spp.*, infección por *Stenotrophomonas maltophilia*, infección por coccobacilos Gram-negativos, infección por *Haemophilus influenza*, infección por *Branhamella catarrhalis*, infección con anaerobios, infección por *Bacteriodes fragilis*, infección por *Clostridium*, infección fúngica, infección por *Candida spp.*, infección por *Candida spp.* no albicans, infección por *Hansenula anomala*, infección por *Malassezia furfur*, infección por micobacterias no tuberculosas, infección por *Mycobacterium avium*, infección por *Mycobacterium chelonae*, infección por *Mycobacterium fortuitum*, infección por espiroquetas, infección por *Borrelia burgdorferi*, además de cualquier otra enfermedad y/o trastorno cardiovascular (por ejemplo, sin septicemia) implicado por los agentes causantes listados anteriormente o en otras partes del presente documento.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos metabólicos: dislipidemia, dislipidemia diabética, dislipidemia mixta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus de tipo II, diabetes de tipo I, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, obesidad, y/o anorexia nerviosa.

La presente invención también abarca combinaciones terapéuticas de un modulador de PCSK9b con una estatina para el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad o trastorno citado en el presente documento, particularmente dislipidemia. Las estatinas representativas incluyen, pero sin limitación, las siguientes: pravastatina, lovastatina, cerivastatina, simvastatina, pitivastatina, atorvastatina o rousuvastatina.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen modular la actividad de transducción de señales en diversas células, tejidos, y organismos, en particular en el hígado, cerebro, tejidos adiposo, de omento, bazo e inflamatorio de mamífero, macrófagos, neutrófilos, histiomonocitos sinoviales, neutrófilos, e histiocitos epitelioides.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar los siguientes trastornos hepáticos: hepatoblastoma, ictericia, hepatitis, enfermedad metabólica hepática y afecciones que son atribuibles a la diferenciación de las células progenitoras de hepatocitos, cirrosis, quistes hepáticos, abscesos pirogénicos, abscesos amebianos, quiste hidatídico, cistadenocarcinoma, adenoma, hiperplasia nodular focal, hemangioma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, y angiosarcoma, enfermedad hepática granulomatosa, trasplante de hígado, hiperbilirrubinemia, ictericia, enfermedad hepática parenquimatosa, hipertensión portal, enfermedad hepatobiliar, parénquima hepático, fibrosis hepática, anemia, cálculos biliares, colestasis, toxicidad de tetracloruro de carbono, toxicidad de berilio, toxicidad de cloruro de vinilo, coledocolitiasis, necrosis hepatocelular, metabolismo aberrante de los aminoácidos, metabolismo aberrante de los hidratos de carbono, síntesis aberrante de proteínas, síntesis aberrante de glucoproteínas, degradación aberrante de proteínas, degradación aberrante de glucoproteínas, metabolismo aberrante de fármacos, degradación aberrante de hormonas, degradación aberrante de fármacos, degradación aberrante de fármacos, regulación aberrante del metabolismo lipídico, regulación aberrante del metabolismo del colesterol, glucogénesis aberrante, glucogenolisis aberrante, glucolisis aberrante, glucogenogénesis aberrante, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, captación de glucosa hepática disminuida, síntesis de glucógeno hepático disminuido, resistencia hepática a la insulina, derivación portal-sistémica de glucosa, resistencia periférica a la insulina, anomalías hormonales, niveles aumentados de glucagón sistémico, niveles disminuidos de cortisol sistémico, niveles aumentados de insulina sistémica, hipoglucemia, glucogenolisis disminuida, contenido de glucógeno hepático disminuido, resistencia hepática al glucagón, niveles elevados de aminoácidos aromáticos sistémicos, niveles disminuidos de aminoácidos de cadena ramificada sistémicos, encefalopatía hepática, transaminación hepática aberrante de aminoácidos, desaminación oxidativa hepática aberrante de aminoácidos,

síntesis aberrante de amoniaco, secreción aberrante de albúmina, hipoalbuminemia, función aberrante de los citocromos b5, función aberrante de P450, función aberrante de glutatión S-aciltransferasa, síntesis aberrante de colesterol, y síntesis aberrante de ácidos biliares.

Además, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, tienen usos que incluyen, directa o indirectamente, tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar las siguientes infecciones hepáticas no limitantes: enfermedad hepática causada por infección septicémica, enfermedad hepática causada por bacteriemia, enfermedad hepática causada por neumonía neumocócica, enfermedad hepática causada por síndrome del choque tóxico, enfermedad hepática causada por listeriosis, enfermedad hepática causada por legionelosis, enfermedad hepática causada por infección por brucelosis, enfermedad hepática causada por infección por *Neisseria gonorrhoeae*, enfermedad hepática causada por infección por *Yersinia*, enfermedad hepática causada por salmonelosis, enfermedad hepática causada por nocardiosis, enfermedad hepática causada por infección por espiroquetas, enfermedad hepática causada por infección por *Treponema pallidum*, enfermedad hepática causada por infección por *Borrelia burgdorferi*, enfermedad hepática causada por leptospirosis, enfermedad hepática causada por infección por *Coxiella burnetii*, enfermedad hepática causada por infección por *Rickettsia richettsii*, enfermedad hepática causada por infección por *Chlamydia trachomatis*, enfermedad hepática causada por infección por *Chlamydia psittaci*, enfermedad hepática causada por infección por virus de la hepatitis, enfermedad hepática causada por infección por virus de Epstein-Barr, además de cualquier otra enfermedad y/o trastorno hepático implicado por los agentes causantes listados anteriormente o en otras partes del presente documento.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, pueden tener usos que incluyen la identificación de moduladores de la función de PCSK9b, incluyendo anticuerpos (para detección o neutralización), moduladores de origen natural y moduladores de molécula pequeña. Los anticuerpos para dominios de la proteína PCSK9b podrían usarse como agentes diagnósticos de trastornos del metabolismo lipídico, incluyendo hipercolesterolemia, entre otros.

El nivel de expresión de PCSK9b también puede ser útil como un biomarcador para predecir qué pacientes pueden encontrarse en riesgo de desarrollar hipercolesterolemia, y/o aquellos pacientes que pueden estar en riesgo de ser demasiado sensibles a la terapia con estatinas.

Los polipéptidos y polinucleótidos de PCSK9b tienen usos adicionales que incluyen diagnosticar enfermedades relacionadas con el exceso o defecto de expresión de PCSK9b identificando mutaciones en el gen de PCSK9b usando secuencias de PCSK9b como sondas o determinando los niveles de expresión de proteína o ARNm de PCSK9b. Los polipéptidos de PCSK9b pueden ser útiles para explorar compuestos que afecten a la actividad de la proteína. Los péptidos de PCSK9b también pueden usarse para la generación de anticuerpos específicos y como cebo en exploraciones de dos híbridos de levadura para encontrar proteínas que interactúan específicamente con PCSK9b (descritas en otras partes del presente documento).

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9b N-terminales: M1-R315, S2-R315, P3-R315, W4-R315, K5-R315, D6-R315, G7-R315, G8-R315, S9-R315, L10-R315, V11-R315, E12-R315, V13-R315, Y14-R315, L15-R315, L16-R315, D17-R315, T18-R315, S19-R315, I20-R315, Q21-R315, S22-R315, D23-R315, H24-R315, R25-R315, E26-R315, I27-R315, E28-R315, G29-R315, R30-R315, V31-R315, M32-R315, V33-R315, T34-R315, D35-R315, F36-R315, E37-R315, N38-R315, V39-R315, P40-R315, E41-R315, E42-R315, D43-R315, G44-R315, T45-R315, R46-R315, F47-R315, H48-R315, R49-R315, Q50-R315, A51-R315, S52-R315, K53-R315, C54-R315, D55-R315, S56-R315, H57-R315, G58-R315, T59-R315, H60-R315, L61-R315, A62-R315, G63-R315, V64-R315, V65-R315, S66-R315, G67-R315, R68-R315, D69-R315, A70-R315, G71-R315, V72-R315, A73-R315, K74-R315, G75-R315, A76-R315, S77-R315, M78-R315, R79-R315, S80-R315, L81-R315, R82-R315, V83-R315, L84-R315, N85-R315, C86-R315, Q87-R315, G88-R315, K89-R315, G90-R315, T91-R315, V92-R315, S93-R315, G94-R315, T95-R315, L96-R315, I97-R315, G98-R315, L99-R315, E100-R315, F101-R315, I102-R315, R103-R315, K104-R315, S105-R315, Q106-R315, L107-R315, V108-R315, Q109-R315, P110-R315, V111-R315, G112-R315, P113-R315, L114-R315, V115-R315, V116-R315, L117-R315, L118-R315, P119-R315, L120-R315, A121-R315, G122-R315, G123-R315, Y124-R315, S125-R315, R126-R315, V127-R315, L128-R315, N129-R315, A130-R315, A131-R315, C132-R315, Q133-R315, R134-R315, L135-R315, A136-R315, R137-R315, A138-R315, G139-R315, V140-R315, V141-R315, L142-R315, V143-R315, T144-R315, A145-R315, A146-R315, G147-R315, N148-R315, F149-R315, R150-R315, D151-R315, D152-R315, A153-R315, C154-R315, L155-R315, Y156-R315, S157-R315, P158-R315, A159-R315, S160-R315, A161-R315, P162-R315, E163-R315, V164-R315, I165-R315, T166-R315, V167-R315, G168-R315, A169-R315, T170-R315, N171-R315, A172-R315, Q173-R315, D174-R315, Q175-R315, P176-R315, V177-R315, T178-R315, L179-R315, G180-R315, T181-R315, L182-R315, G183-R315, T184-R315, N185-R315, F186-R315, G187-R315, R188-R315, C189-R315, V190-R315, D191-R315, L192-R315, F193-R315, A194-R315, P195-R315, G196-R315, E197-R315, D198-R315, I199-R315, I200-R315, G201-R315, A202-R315, S203-R315, S204-R315, D205-R315, C206-R315, S207-R315, T208-R315, C209-R315, F210-R315, V211-R315, S212-R315, Q213-R315, S214-R315, G215-R315, T216-R315, S217-R315, Q218-R315, A219-R315, A220-R315, A221-R315, H222-R315, V223-R315, A224-R315, G225-R315, I226-R315, A227-R315, A228-R315, M229-R315, D230-R315, L231-R315, S232-R315, A233-R315, E234-R315, P235-R315, E236-R315, L237-R315, T238-R315, L239-R315, A240-R315, E241-R315, L242-R315, R243-R315, Q244-R315, R245-R315, L246-R315, I247-R315,

H248-R315, F249- R315, S250-R315, A251-R315, K252-R315, D253-R315, V254-R315, I255-R315, N256-R315, E257-R315, A258-R315, W259-R315, F260-R315, P261-R315, E262-R315, D263-R315, Q264-R315, R265-R315, V266-R315, L267-R315, T268-R315, P269-R315, N270-R315, L271-R315, V272-R315, A273-R315, A274-R315, L275-R315, P276-R315, P277- R315, S278-R315, T279-R315, H280-R315, G281-R315, A282-R315, G283-R315, P284-R315, F285-R315, C286- R315, R287-R315, L288-R315, A289-R315, A290-R315, V291-R315, L292-R315, Q293-R315, D294-R315, C295-R315, V296-R315, V297-R315, S298-R315, T299-R315, L300-R315, G301-R315, A302-R315, Y303-R315, T304-R315, D305- R315, G306-R315, H307-R315, S308-R315, y/o H309-R315 de SEC ID N°: 2. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento. Además, en el presente documento se describen polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos tan largo como uno cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9b de eliminación N-terminal pueden usarse como epítomos inmunogénicos y/o antigénicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9b C-terminales: M1-R315, M1-P314, M1-R313, M1-L312, M1-P311, M1-R310, M1- H309, M1-S308, M1-H307, M1-G306, M1-D305, M1-T304, M1-Y303, M1-A302, M1-G301, M1-L300, M1-T299, M1-5298, M1-V297, M1-V296, M1-C295, M1-D294, M1-Q293, M1-L292, M1-V291, M1-A290, M1-A289, M1-L288, M1-R287, M1- C286, M1-F285, M1-P284, M1-G283, M1-A282, M1-G281, M1-H280, M1-T279, M1-S278, M1-P277, M1-P276, M1- L275, M1-A274, M1-A273, M1-V272, M1-L271, M1-N270, M1-P269, M1-T268, M1-L267, M1-V266, M1-R265, M1-Q264, M1-D263, M1-E262, M1-P261, M1-F260, M1-W259, M1-A258, M1-E257, M1-N256, M1-1255, M1-V254, M1-D253, M1- K252, M1-A251, M1-S250, M1-F249, M1-H248, M1-I247, M1-L246, M1-R245, M1-Q244, M1-R243, M1-L242, M1-E241, M1-A240, M1-L239, M1-T238, M1-L237, M1-E236, M1-P235, M1-E234, M1-A233, M1-S232, M1-L231, M1-M230, M1- M229, M1-A228, M1-A227, M1-I226, M1-G225, M1-A224, M1-V223, M1-H222, M1-A221, M1-A220, M1-A219, M1- Q218, M1-S217, M1-T216, M1-G215, M1-S214, M1-Q213, M1-S212, M1-V211, M1-F210, M1-C209, M1-T208, M1- S207, M1-C206, M1-D205, M1-S204, M1-S203, M1-A202, M1-G201, M1-I200, M1-I199, M1-D198, M1-E197, M1-G196, M1-P195, M1-A194, M1-F193, M1-L192, M1-D191, M1-V190, M1-C189, M1-R188, M1-G187, M1-F186, M1-N185, M1- T184, M1-G183, M1-L182, M1-T181, M1-G180, M1-L179, M1-T178, M1-V177, M1-P176, M1-Q175, M1-D174, M1- Q173, M1-A172, M1-N171, M1-T170, M1-A169, M1-G168, M1-V167, M1-T166, M1-I165, M1-V164, M1-E163, M1-P162, M1-A161, M1-S160, M1-A159, M1-P158, M1-S157, M1-Y156, M1-L155, M1-C154, M1-A153, M1-D152, M1-D151, M1- R150, M1-F149, M1-N148, M1-G147, M1-A146, M1-A145, M1-T144, M1-V143, M1-L142, M1-V141, M1-V140, M1- G139, M1-A138, M1-R137, M1-A136, M1-L135, M1-R134, M1-Q133, M1-C132, M1-A131, M1-A130, M1-N129, M1- L128, M1-V127, M1-R126, M1-S125, M1-Y124, M1-G123, M1-G122, M1-A121, M1-L120, M1-P119, M1-L118, M1-L117, M1-V116, M1-V115, M1-L114, M1-P113, M1-G112, M1-V111, M1-P110, M1-Q109, M1-V108, M1-L107, M1-Q106, M1- S105, M1-K104, M1-R103, M1-I102, M1-F101, M1-E100, M1-L99, M1-G98, M1-I97, M1-L96, M1-T95, M1-G94, M1- S93, M1-V92, M1-T91, M1-G90, M1-K89, M1-G88, M1-G87, M1-C86, M1-N85, M1-L84, M1-V83, M1-R82, M1-L81, M1-S80, M1-R79, M1-M78, M1-S77, M1-A76, M1-G75, M1-K74, M1-A73, M1-V72, M1-G71, M1-A70, M1-D69, M1-R68, M1-G67, M1-S66, M1-V65, M1-V64, M1-G63, M1-A62, M1-L61, M1-H60, M1-T59, M1-G58, M1-H57, M1-S56, M1-D55, M1-C54, M1-K53, M1-S52, M1-A51, M1-Q50, M1-R49, M1-H48, M1-F47, M1-R46, M1-T45, M1-G44, M1-D43, M1-E42, M1-E41, M1-P40, M1-V39, M1-N38, M1-E37, M1-F36, M1-D35, M1-T34, M1-V33, M1-M32, M1-V31, M1-R30, M1-G29, M1-E28, M1-I27, M1-E26, M1-R25, M1-H24, M1-D23, M1-S22, M1-Q21, M1-I20, M1-S19, M1-T18, M1-D17, M1-L16, M1-L15, M1-Y14, M1-V13, M1-E12, M1-V11, M1-L10, M1-S9, M1-G8, y/o M1-G7 de SEC ID N°: 2. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento. Además, en el presente documento se describen polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos tan largo como uno cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9b de eliminación C-terminal pueden usarse como epítomos inmunogénicos y/o antigénicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden secuencias polipeptídicas que corresponden, por ejemplo, a regiones internas del polipéptido de PCSK9b (por ejemplo, cualquier combinación de eliminaciones tanto N-terminales como C-terminales del polipéptido de PCSK9b) de SEC ID N°: 2. Por ejemplo, las regiones internas pueden definirse mediante la ecuación: aminoácido NX hasta aminoácido CX, en el que NX se refiere a cualquier eliminación N-terminal de aminoácidos del polipéptido de PCSK9b (SEC ID N°: 2), y donde CX se refiere a cualquier eliminación C-terminal de aminoácidos del polipéptido de PCSK9b (SEC ID N°: 2). También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. Estos polipéptidos pueden usarse como epítomo inmunogénico y/o antigénico, tal como se describe en otras partes del presente documento.

También se describen en el presente documento epítomos inmunogénicos y/o antigénicos del polipéptido de PCSK9b.

Muchas secuencias polinucleotídicas, tales como las secuencias EST, están públicamente disponibles y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEC ID N°: 1 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferentemente, dichos polinucleótidos relacionados se excluyen específicamente del ámbito de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada podría ser trabajo. Por consiguiente, se excluyen preferentemente de la presente invención uno o más polinucleótidos que consisten en una secuencia nucleotídica descrita por la fórmula general a-b, donde a es cualquier número entero entre 1 a 3161 de SEC ID N°: 1, b es un número entero entre 15 a 3175, donde ambos a y b

corresponden a las posiciones de restos de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 1, y donde b es mayor o igual a a+14.

Características del polipéptido codificado por el polinucleótido N°: 2

El polipéptido de este polinucleótido proporcionado como SEC ID N°: 4 (Figuras 2A-D), codificado por la secuencia polinucleotídica de acuerdo con SEC ID N°: 3 (Figuras 2A-D), y/o codificado por el polinucleótido contenido en el clon depositado, PCSK9c (también citado como PCSK9-c), es una variante del polipéptido PCSK9 humano (PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|NM_174936; SEC ID N°: 5). Se proporciona un alineamiento del polipéptido PCSK9c con PCSK9 además de con una variante de PCSK9 conocida (variante de PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|AK124635; SEC ID N°: 6) en las Figuras 3A-C. Los valores de identidad y similitud porcentual entre el polipéptido PCSK9c con estos polipéptidos se proporcionan en la Figura 4.

La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc de PCSK9c en las Figuras 2A-D (SEC ID N°: 3) contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de aproximadamente 523 restos de aminoácidos, con un peso molecular deducido de aproximadamente 55,2 kDa. La secuencia de aminoácidos del polipéptido PCSK9c predicho se muestra en las Figuras 2A-D (SEC ID N°: 4).

Se predijo que el polipéptido PCSK9c comprende un dominio catalítico localizado desde aproximadamente el aminoácido 10 hasta aproximadamente el aminoácido 256 de SEC ID N°: 4, residiendo la tríada catalítica canónica en los aminoácidos D17, H57, y S217 de SEC ID N°: 4; y seis restos conservados de cisteína localizados en los aminoácidos C54, C86, C132, C154, C189, y C206 de SEC ID N°: 4 prediciéndose que los enlaces disulfuro se formarán entre los siguientes pares de cisteínas: C54 y C86, y C154 y C189; y un dominio predicho de unión a Ca^{2+} que se predice que se formará entre los restos D191, P162, y V164 de SEC ID N°: 4. En este contexto, puede entenderse que el término "aproximadamente" significa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos más allá de los límites N-terminal y/o C-terminal de las localizaciones de aminoácidos anteriormente citadas.

Ya que el polipéptido de PCSK9c retiene la tríada catalítica del polipéptido PCSK9 de tipo silvestre, además de sus cisteínas conservadas, se espera que el polipéptido de PCSK9c retenga la actividad biológica de PCSK9, incluyendo, pero sin limitación, actividad de proteinasa, actividad de convertasa, actividad de proteasa subtilisina-kexina isozima-1/sitio 1, actividad autocatalítica escindiendo PCSK9, PCSK9b, PCSK9c, u otras variantes de PCSK9 entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos Gln-151 y Ser-152; actividad reguladora de la expresión génica dependiente de colesterol (Maxwell et al., J Lipid Res. 2003; 44: 2109-2119), actividad reguladora de la expresión génica dependiente de insulina (Shimomura et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96: 13656-13661), actividad reguladora de la expresión génica dependiente de factor de transcripción LXR (Repa et al., Genes Dev. 2000; 14: 2819-2830); actividad reguladora de proteína receptora de LDL (Maxwell et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 7100-7105); actividad de regulación positiva dependiente de estatinas (Dubuc et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24: 1454-1459).

Para confirmar que PCSK9c retiene la actividad biológica de PCSK9, se llevaron a cabo ensayos de captación de Dil-LDL y se demostró que PCSK9c tenía actividad de PCSK9. Sorprendentemente, se descubrió que PCSK9c tiene mayor actividad que PCSK9 de tipo silvestre. El ensayo de captación de Dil-LDL es un ensayo funcional normalizado para el receptor de LDLR, y la actividad de PCSK9 actúa reduciendo la actividad de LDLR. Por lo tanto, la captación de Dil-LDL por células puede usarse como un ensayo funcional subrogado para medir la actividad de PCSK9. La expresión transitoria de PCSK9c actuó para disminuir la captación de Dil-LDL en células HepG2, en comparación con el control de vector, lo que indica que PCSK9c es competente para expresar actividad funcional de PCSK9 en LDLR (Fig. 9). En este ensayo, PCSK9c mostró mayor actividad que tanto PCSK9 como PCSK9b. Por consiguiente, PCSK9c retiene la capacidad de PCSK9 para modular la actividad funcional en LDLR.

Se demostró que PCSK9c tiene aproximadamente un 50 % más de función que PCSK9 de tipo silvestre, tal como se demostró en el ensayo de captación de LDL (véase la Figura 9A). Por consiguiente, la invención se refiere además al truncamiento N-terminal de PCSK9, tal como, por ejemplo, PCSK9c (SEC ID N°: 4), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado una elevación de la actividad biológica de PCSK9, incluyendo, pero sin limitación, niveles disminuidos de proteína LDLR y/o captación disminuida de LDL por LDLR, y en el que dicha actividad biológica de PCSK9 elevada es al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 100 %, o más que la actividad biológica elevada de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 1, 2, 3, 4, o un 5 por ciento más o menos de la cantidad citada. Como alternativa, dicha actividad biológica elevada de PCSK9 puede ser al menos aproximadamente 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x más que la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 0,1x, 0,2x, 0,3x, 0,4x, 0,5x, 0,6x, 0,7x, 0,8x, o 0,9x más o menos de la cantidad citada.

En el presente documento se describe un polinucleótido que comprende un polipéptido que codifica al menos 301 aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 4. También se describe en el presente documento un polipéptido que comprende al menos 496 aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 4. También se describe en el presente documento un polipéptido que comprende al menos 518 aminoácidos expuestos en SEC ID N°: 4. También se describe en el presente

documento un polinucleótido que comprende al menos 903 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 3. También se describe en el presente documento un polinucleótido que comprende al menos 1488 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 3. También se describe en el presente documento un polinucleótido que comprende al menos 1554 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 3. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos más o menos en el los extremos N- o C-terminal, o ambos, o 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos en el extremo 5 prima o 3 prima, o ambos. Preferentemente, los polipéptidos y/o los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos mantienen actividad biológica.

En el presente documento se describe un polinucleótido que carece del codon de iniciación además de la metionina del polipéptido codificado de PCSK9c resultante. Específicamente, el polinucleótido corresponde a los nucleótidos 884 hasta 2049 de SEC ID N°: 3, y el polipéptido corresponde a los aminoácidos 2 hasta 523 de SEC ID N°: 4. También se describen en el presente documento vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

Ya que el polipéptido PCSK9c representa una variante del polipéptido PCSK9 de tipo silvestre (PCSK9; N° de Referencia de GENBANK®: gi|NM_174936; SEC ID N°: 5), se espera que el patrón de expresión de la variante PCSK9c sea el mismo o similar al del polipéptido PCSK9.

Tal como se describe en el presente documento, se ha demostrado que las mutaciones de sentido erróneo de PCSK9 de tipo silvestre en las localizaciones de aminoácidos S127R, F216L y D374Y dan como resultado función aberrante de la proteína PCSK9, dando como resultado la incidencia de hipercolesterolemia (Attie, A.D., Art. Thromb. and Vasc. Biol., 2004;24:1337). Por consiguiente, las mismas mutaciones en las posiciones de aminoácidos correspondientes del polipéptido de PCSK9c de la presente invención serían útiles en métodos para diagnosticar a pacientes susceptibles a la aparición de hipercolesterolemia. Cabe destacar que PCSK9c carece de un aminoácido correspondiente para la mutación S127R a causa del corte y empalme alternativo (véase el alineamiento proporcionado en las Figuras 3A-C).

En el presente documento se describe un polinucleótido de SEC ID N°: 4, en el que la serina en la posición de aminoácido 47 se sustituye con una leucina. En el presente documento se describe un polipéptido de SEC ID N°: 4 que carece del codon de iniciación, además de la metionina del polipéptido de PCSK9c codificado resultante, en el que la serina en la posición de aminoácido 47 se sustituye con una leucina. También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. También se describen en el presente documento vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

En el presente documento se describe un polinucleótido de SEC ID N°: 4, en el que el ácido aspártico en la posición de aminoácido 205 se sustituye con una tirosina. En el presente documento se describe un polipéptido de SEC ID N°: 4 que carece del codon de iniciación, además de la metionina del polipéptido de PCSK9c codificado resultante, en el que el ácido aspártico en la posición de aminoácido 205 se sustituye con una tirosina. También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. También se describen en el presente documento vectores recombinantes que comprenden dicha secuencia codificante, y células hospedadoras que comprenden dicho vector.

Se determinó que el polipéptido PCSK9 de tipo silvestre se expresa predominantemente en el hígado y en el tejido neuronal, y en menor medida en células mesenquimales del riñón y en los epitelios intestinales (Seidah et al., PNAS 100(3):928-933 (2003)).

El perfil de expresión diseñado para medir los niveles en estado estacionario de ARNm que codifica los polipéptidos PCSK9b y PCSK9c confirmó que compartían el patrón de expresión predominante hepático y neuronal de PCSK9 de tipo silvestre. Específicamente, PCSK9b y PCSK9c se expresaron predominantemente en el hígado y en el cerebelo a niveles que eran más de 3500 veces el del tejido con la menor expresión (el corazón). PCSK9b y PCSK9c también se expresaron de manera relativamente elevada en el pulmón y su vasculatura asociada. PCSK9b y PCSK9c también se expresaron a lo largo del tracto gastrointestinal (véase la Figura 6). La expresión de PCSK9b y PCSK9c en el cerebelo indica que PCSK9b y PCSK9c pueden funcionar en la diferenciación neuronal.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos: hipercolesterolemia dominante autosómica; trastornos asociados con la función aberrante del receptor de LDL; trastornos asociados con apolipoproteína B; trastornos asociados con la hipercolesterolemia recesiva autosómica; trastornos asociados con el colesterol elevado; trastornos asociados con LDL elevadas; trastornos asociados con la velocidad de eliminación reducida de las LDL en el hígado; trastornos asociados con la producción elevada de apoB de LDL; hipercolesterolemia familiar; trastornos del metabolismo de lípidos; LDL elevadas; depósitos de colesterol; xantomas de tendón; ateroma; arteriosclerosis prematura; enfermedad coronaria; apolipoproteína B defectuosa familiar; hipersensibilidad a estatinas; trastornos asociados con la degradación acelerada de LDLR.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos: trastornos de la diferenciación neuronal.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos cardiovasculares: infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias, cardiomiopatía, aterosclerosis, esclerosis arterial, enfermedad microvascular, embolismo, trombosis, edema pulmonar, palpitación, disnea, angina, hipotensión, síncope, soplo cardíaco, ECG aberrante, cardiomiopatía hipertrófica, el síndrome de Marfan, muerte súbita, síndrome del QT largo, defectos congénitos, infecciones virales cardíacas, enfermedad coronaria valvular, hipertensión, entre otras divulgadas en el presente documento, particularmente en la sección "Trastornos cardiovasculares" y a continuación.

De manera similar, los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c pueden ser útiles para mejorar enfermedades cardiovasculares y síntomas que son el resultado indirecto de varios efectos no cardiovasculares, que incluyen, pero sin limitación, los siguientes, obesidad, tabaquismo, síndrome de Down (asociado con defecto en la almohadilla endocárdica); anomalías óseas de las extremidades superiores (asociadas con una comunicación interauricular en el síndrome de Holt-Oram); distrofias musculares (asociadas con cardiomiopatía); hemocromatosis y enfermedad de almacenamiento de glucógeno (asociados con la infiltración miocárdica y la cardiomiopatía restrictiva); sordera congénita (asociada con un intervalo QT prolongado y arritmias cardíacas graves); enfermedad de Raynaud (asociada con hipertensión pulmonar primaria y vasoespasma coronario); trastornos del tejido conectivo, es decir, el síndrome de Marfan, los síndromes de Ehlers-Danlos y de Hurler, y trastornos relacionados del metabolismo de mucopolisacáridos (dilatación aórtica, prolapso de válvula mitral, una serie de anomalías arteriales); acromegalia (hipertensión, aterosclerosis coronaria acelerada, defectos en la conducción, cardiomiopatía); hipertiroidismo (insuficiencia cardíaca, fibrilación auricular); hipotiroidismo (efusión pericárdica, cardiopatía isquémica); artritis reumatoide (pericarditis, valvulopatía aórtica); esclerodermia (cor pulmonar, fibrosis miocárdica, pericarditis); lupus eritematoso sistémico (valvulitis, miocarditis, pericarditis); sarcoidosis (arritmias, cardiomiopatía); efectos postmenopáusicos, infecciones por clamidia, enfermedad del ovario poliquístico, enfermedad tiroidea, el alcoholismo, la dieta, y dermatitis exfoliativa (insuficiencia cardíaca de alto gasto), por ejemplo.

Además, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, tienen usos que incluyen, directa o indirectamente, tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar las siguientes infecciones cardiovasculares no limitantes: invasión del torrente sanguíneo, bacteriemia, septicemia, infección por *Streptococcus pneumoniae*, infección por estreptococos de grupo a, infección por estreptococos de grupo b, infección por *Enterococcus*, infección por estreptococos de grupo D no enterocócicos, infección por estreptococos de grupo C no enterocócicos, infección por estreptococos de grupo G no enterocócicos, infección por *Streptococcus viridans*, infección por *Staphylococcus aureus*, infección estafilocócica negativa a coagulasa, infección por bacilos Gram-negativos, infección por enterobacterias, infección por *Pseudomonas spp.*, infección por *Acinobacter spp.*, infección por *Flavobacterium meningosepticum*, infección por *Aeromonas spp.*, infección por *Stenotrophomonas maltophilia*, infección por coccobacilos Gram-negativos, infección por *Haemophilus influenza*, infección por *Branhamella catarrhalis*, infección por anaerobios, infección por *Bacteriodes fragilis*, infección por *Clostridium*, infección fúngica, infección por *Candida spp.*, infección por *Candida spp.* no albicans, infección por *Hansenula anomala*, infección por *Malassezia furfur*, infección por micobacterias no tuberculosas, infección por *Mycobacterium avium*, infección por *Mycobacterium chelonae*, infección por *Mycobacterium fortuitum*, infección por espiroquetas, infección por *Borrelia burgdorferi*, además de cualquier otra enfermedad y/o trastorno cardiovascular (por ejemplo, sin septicemia) implicado por los agentes causantes listados anteriormente o en otras partes del presente documento.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar las siguientes enfermedades y/o trastornos metabólicos: dislipidemia, dislipidemia diabética, dislipidemia mixta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus de tipo II, diabetes de tipo I, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, obesidad, y/o anorexia nerviosa.

La presente invención también abarca combinaciones terapéuticas de un modulador de PCSK9c con una estatina para el tratamiento, prevención y/o mejora de una enfermedad o trastorno citado en el presente documento, particularmente dislipidemia. Las estatinas representativas incluyen, pero sin limitación, las siguientes: pravastatina, lovastatina, cerivastatina, simvastatina, pitivastatina, atorvastatina o rousuvastatina.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen modular la actividad de transducción de señales en diversas células, tejidos, y organismos, en particular en el hígado, cerebro, tejidos adiposo, de omento, bazo e inflamatorio de mamífero, macrófagos, neutrófilos, histiomonocitos sinoviales, neutrófilos, e histiocitos epitelioides.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c de la presente invención, incluyendo moduladores y/o fragmentos de los mismos, tienen usos que incluyen detectar, pronosticar, tratar, prevenir, y/o mejorar los siguientes trastornos hepáticos: hepatoblastoma, ictericia, hepatitis, enfermedad metabólica hepática y afecciones que son atribuibles a la diferenciación de las células progenitoras de hepatocitos, cirrosis, quistes hepáticos, abscesos pirogénicos, abscesos amebianos, quiste hidatídico, cistadenocarcinoma, adenoma, hiperplasia nodular focal, hemangioma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, y angiosarcoma, enfermedad hepática granulomatosa, trasplante de hígado, hiperbilirrubinemia, ictericia, enfermedad hepática parenquimatosa, hipertensión portal, enfermedad hepatobiliar,

parénquima hepático, fibrosis hepática, anemia, cálculos biliares, colestasis, toxicidad de tetracloruro de carbono, toxicidad de berilio, toxicidad de cloruro de vinilo, coledocolitiasis, necrosis hepatocelular, metabolismo aberrante de los aminoácidos, metabolismo aberrante de los hidratos de carbono, síntesis aberrante de proteínas, síntesis aberrante de glucoproteínas, degradación aberrante de proteínas, degradación aberrante de glucoproteínas, metabolismo aberrante de fármacos, degradación aberrante de hormonas, degradación aberrante de fármacos, degradación aberrante de fármacos, regulación aberrante del metabolismo lipídico, regulación aberrante del metabolismo del colesterol, glucogénesis aberrante, glucogenolisis aberrante, glucolisis aberrante, glucogenogénesis aberrante, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, captación de glucosa hepática disminuida, síntesis de glucógeno hepático disminuido, resistencia hepática a la insulina, derivación portal-sistémica de glucosa, resistencia periférica a la insulina, anomalías hormonales, niveles aumentados de glucagón sistémico, niveles disminuidos de cortisol sistémico, niveles aumentados de insulina sistémica, hipoglucemia, glucogenolisis disminuida, contenido de glucógeno hepático disminuido, resistencia hepática al glucagón, niveles elevados de aminoácidos aromáticos sistémicos, niveles disminuidos de aminoácidos de cadena ramificada sistémicos, encefalopatía hepática, transaminación hepática aberrante de aminoácidos, desaminación oxidativa hepática aberrante de aminoácidos, síntesis aberrante de amoniaco, secreción aberrante de albúmina, hipoalbuminemia, función aberrante de los citocromos b5, función aberrante de P450, función aberrante de glutatión S-aciltransferasa, síntesis aberrante de colesterol, y síntesis aberrante de ácidos biliares.

Además, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, tienen usos que incluyen, directa o indirectamente, tratar, prevenir, diagnosticar, y/o pronosticar las siguientes infecciones hepáticas no limitantes: enfermedad hepática causada por infección septicémica, enfermedad hepática causada por bacteriemia, enfermedad hepática causada por neumonía neumocócica, enfermedad hepática causada por síndrome del choque tóxico, enfermedad hepática causada por listeriosis, enfermedad hepática causada por legionelosis, enfermedad hepática causada por infección por brucelosis, enfermedad hepática causada por infección por *Neisseria gonorrhoeae*, enfermedad hepática causada por infección por *Yersinia*, enfermedad hepática causada por salmonelosis, enfermedad hepática causada por nocardiosis, enfermedad hepática causada por infección por espiroquetas, enfermedad hepática causada por infección por *Treponema pallidum*, enfermedad hepática causada por infección por *Borrelia burgdorferi*, enfermedad hepática causada por leptospirosis, enfermedad hepática causada por infección por *Coxiella burnetii*, enfermedad hepática causada por infección por *Rickettsia rickettsii*, enfermedad hepática causada por infección por *Chlamydia trachomatis*, enfermedad hepática causada por infección por *Chlamydia psittaci*, enfermedad hepática causada por infección por virus de la hepatitis, enfermedad hepática causada por infección por virus de Epstein-Barr, además de cualquier otra enfermedad y/o trastorno hepático implicado por los agentes causantes listados anteriormente o en otras partes del presente documento.

Los polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9c, incluyendo fragmentos y/o antagonistas de los mismos, pueden tener usos que incluyen la identificación de moduladores de la función de PCSK9c, incluyendo anticuerpos (para detección o neutralización), moduladores de origen natural y moduladores de molécula pequeña. Los anticuerpos para dominios de la proteína PCSK9c podrían usarse como agentes diagnósticos de trastornos del metabolismo lipídico, incluyendo hipercolesterolemia, entre otros.

El nivel de expresión de PCSK9c también puede ser útil como un biomarcador para predecir qué pacientes pueden encontrarse en riesgo de desarrollar hipercolesterolemia, y/o aquellos pacientes que pueden estar en riesgo de ser demasiado sensibles a la terapia con estatinas.

Los polipéptidos y polinucleótidos de PCSK9c tienen usos adicionales que incluyen diagnosticar enfermedades relacionadas con el exceso o defecto de expresión de PCSK9c identificando mutaciones en el gen de PCSK9c usando secuencias de PCSK9c como sondas o determinando los niveles de expresión de proteína o ARNm de PCSK9c. Los polipéptidos de PCSK9c pueden ser útiles para explorar compuestos que afecten a la actividad de la proteína. Los péptidos de PCSK9c también pueden usarse para la generación de anticuerpos específicos y como cebo en exploraciones de dos híbridos de levadura para encontrar proteínas que interactúan específicamente con PCSK9c (descritas en otras partes del presente documento).

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9c N-terminales: M1-Q523, S2-Q523, P3-Q523, W4-Q523, K5-Q523, D6-Q523, G7-Q523, G8-Q523, S9-Q523, L10-Q523, V11-Q523, E12-Q523, V13-Q523, Y14-Q523, L15-Q523, L16-Q523, D17-Q523, T18-Q523, S19-Q523, I20-Q523, Q21-Q523, S22-Q523, D23-Q523, H24-Q523, R25-Q523, E26-Q523, I27-Q523, E28-Q523, G29-Q523, R30-Q523, V31-Q523, M32-Q523, V33-Q523, T34-Q523, D35-Q523, F36-Q523, E37-Q523, N38-Q523, V39-Q523, P40-Q523, E41-Q523, E42-Q523, D43-Q523, G44-Q523, T45-Q523, R46-Q523, F47-Q523, H48-Q523, R49-Q523, Q50-Q523, A51-Q523, S52-Q523, K53-Q523, C54-Q523, D55-Q523, S56-Q523, H57-Q523, G58-Q523, T59-Q523, H60-Q523, L61-Q523, A62-Q523, G63-Q523, V64-Q523, V65-Q523, S66-Q523, G67-Q523, R68-Q523, D69-Q523, A70-Q523, G71-Q523, V72-Q523, A73-Q523, K74-Q523, G75-Q523, A76-Q523, S77-Q523, M78-Q523, R79-Q523, S80-Q523, L81-Q523, R82-Q523, V83-Q523, L84-Q523, N85-Q523, C86-Q523, Q87-Q523, G88-Q523, K89-Q523, G90-Q523, T91-Q523, V92-Q523, S93-Q523, G94-Q523, T95-Q523, L96-Q523, I97-Q523, G98-Q523, L99-Q523, E100-Q523, F101-Q523, I102-Q523, R103-Q523, K104-Q523, S105-Q523, Q106-Q523, L107-Q523, V108-Q523, Q109-Q523, P110-Q523, V111-Q523, G112-Q523, P113-Q523, L114-Q523, V115-Q523, V116-Q523, L117-Q523, L118-Q523, P119-Q523, L120-Q523,

A121-Q523, G122-Q523, G123-Q523, Y124-Q523, S125-Q523, R126-Q523, V127-Q523, L128-Q523, N129-Q523, A130-Q523, A131-Q523, C132-Q523, Q133-Q523, R134-Q523, L135-Q523, A136-Q523, R137-Q523, A138-Q523, G139-Q523, V140-Q523, V141-Q523, L142-Q523, V143-Q523, T144-Q523, A145-Q523, A146-Q523, G147-Q523, N148-Q523, F149-Q523, R150-Q523, D151-Q523, D152-Q523, A153-Q523, C154-Q523, L155-Q523, Y156-Q523, S157-Q523, P158-Q523, A159-Q523, S160-Q523, A161-Q523, P162-Q523, E163-Q523, V164-Q523, I165-Q523, T166-Q523, V167-Q523, G168-Q523, A169-Q523, T170-Q523, N171-Q523, A172-Q523, Q173-Q523, D174-Q523, Q175-Q523, P176-Q523, V177-Q523, T178-Q523, L179-Q523, G180-Q523, T181-Q523, L182-Q523, G183-Q523, T184-Q523, N185-Q523, F186-Q523, G187-Q523, R188-Q523, C189-Q523, V190-Q523, D191-Q523, L192-Q523, F193-Q523, A194-Q523, P195-Q523, G196-Q523, E197-Q523, D198-Q523, I199-Q523, I200-Q523, G201-Q523, A202-Q523, S203-Q523, S204-Q523, D205-Q523, C206-Q523, S207-Q523, T208-Q523, C209-Q523, F210-Q523, V211-Q523, S212-Q523, Q213-Q523, S214-Q523, G215-Q523, T216-Q523, S217-Q523, Q218-Q523, A219-Q523, A220-Q523, A221-Q523, H222-Q523, V223-Q523, A224-Q523, G225-Q523, I226-Q523, A227-Q523, A228-Q523, M229-Q523, M230-Q523, L231-Q523, S232-Q523, A233-Q523, E234-Q523, P235-Q523, E236-Q523, L237-Q523, T238-Q523, L239-Q523, A240-Q523, E241-Q523, L242-Q523, R243-Q523, Q244-Q523, R245-Q523, L246-Q523, I247-Q523, H248-Q523, F249-Q523, S250-Q523, K252-Q523, D253-Q523, V254-Q523, I255-Q523, N256-Q523, E257-Q523, A258-Q523, W259-Q523, F260-Q523, P261-Q523, E262-Q523, D263-Q523, Q264-Q523, R265-Q523, V266-Q523, L267-Q523, T268-Q523, P269-Q523, N270-Q523, L271-Q523, V272-Q523, A273-Q523, A274-Q523, L275-Q523, P276-Q523, P277-Q523, S278-Q523, T279-Q523, H280-Q523, G281-Q523, A282-Q523, G283-Q523, W284-Q523, Q285-Q523, L286-Q523, F287-Q523, C288-Q523, R289-Q523, T290-Q523, V291-Q523, W292-Q523, S293-Q523, A294-Q523, H295-Q523, S296-Q523, G297-Q523, P298-Q523, T299-Q523, R300-Q523, M301-Q523, A302-Q523, T303-Q523, A304-Q523, I305-Q523, A306-Q523, R307-Q523, C308-Q523, A309-Q523, P310-Q523, D311-Q523, E312-Q523, E313-Q523, L314-Q523, L315-Q523, S316-Q523, C317-Q523, S318-Q523, S319-Q523, F320-Q523, S321-Q523, R322-Q523, S323-Q523, G324-Q523, K325-Q523, R326-Q523, R327-Q523, G328-Q523, E329-Q523, R330-Q523, M331-Q523, E332-Q523, A333-Q523, Q334-Q523, G335-Q523, G336-Q523, K337-Q523, L338-Q523, V339-Q523, C340-Q523, R341-Q523, A342-Q523, H343-Q523, N344-Q523, A345-Q523, F346-Q523, G347-Q523, G348-Q523, E349-Q523, G350-Q523, V351-Q523, Y352-Q523, A353-Q523, I354-Q523, A355-Q523, R356-Q523, C357-Q523, C358-Q523, L359-Q523, L360-Q523, P361-Q523, Q362-Q523, A363-Q523, N364-Q523, C365-Q523, S366-Q523, V367-Q523, H368-Q523, T369-Q523, A370-Q523, P371-Q523, P372-Q523, A373-Q523, E374-Q523, A375-Q523, S376-Q523, M377-Q523, G378-Q523, T379-Q523, R380-Q523, V381-Q523, H382-Q523, C383-Q523, H384-Q523, Q385-Q523, Q386-Q523, G387-Q523, H388-Q523, V389-Q523, L390-Q523, T391-Q523, G392-Q523, C393-Q523, S394-Q523, S395-Q523, H396-Q523, W397-Q523, E398-Q523, V399-Q523, E400-Q523, D401-Q523, L402-Q523, G403-Q523, T404-Q523, H405-Q523, K406-Q523, P407-Q523, P408-Q523, V409-Q523, L410-Q523, R411-Q523, P412-Q523, R413-Q523, G414-Q523, Q415-Q523, P416-Q523, N417-Q523, Q418-Q523, C419-Q523, V420-Q523, G421-Q523, H422-Q523, R423-Q523, E424-Q523, A425-Q523, S426-Q523, I427-Q523, H428-Q523, A429-Q523, S430-Q523, C431-Q523, C432-Q523, H433-Q523, A434-Q523, P435-Q523, G436-Q523, L437-Q523, A438-Q523, C439-Q523, K440-Q523, V441-Q523, K442-Q523, E443-Q523, H444-Q523, G445-Q523, I446-Q523, P447-Q523, A448-Q523, P449-Q523, Q450-Q523, E451-Q523, Q452-Q523, V453-Q523, T454-Q523, V455-Q523, A456-Q523, C457-Q523, E458-Q523, E459-Q523, G460-Q523, W461-Q523, T462-Q523, L463-Q523, T464-Q523, G465-Q523, C466-Q523, S467-Q523, A468-Q523, L469-Q523, P470-Q523, G471-Q523, T472-Q523, S473-Q523, H474-Q523, V475-Q523, L476-Q523, G477-Q523, A478-Q523, Y479-Q523, A480-Q523, V481-Q523, D482-Q523, N483-Q523, T484-Q523, C485-Q523, V486-Q523, V487-Q523, R488-Q523, S489-Q523, R490-Q523, D491-Q523, V492-Q523, S493-Q523, T494-Q523, T495-Q523, G496-Q523, S497-Q523, T498-Q523, S499-Q523, E500-Q523, G501-Q523, A502-Q523, V503-Q523, T504-Q523, A505-Q523, V506-Q523, A507-Q523, I508-Q523, C509-Q523, C510-Q523, R511-Q523, S512-Q523, R513-Q523, H514-Q523, L515-Q523, A516-Q523, y/o Q517-Q523 de SEC ID N°: 4. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento. Además, en el presente documento se describe un polipéptido que es al menos tan largo como cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9c de eliminación N-terminal pueden usarse como epítomos inmunogénicos y/o antigénicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9c C-terminales: M1-Q523, M1-L522, M1-E521, M1-Q520, M1-S519, M1-A518, M1-Q517, M1-A516, M1-L515, M1-H514, M1-R513, M1-S512, M1-R511, M1-C510, M1-C509, M1-I508, M1-A507, M1-V506, M1-A505, M1-T504, M1-V503, M1-A502, M1-G501, M1-E500, M1-S499, M1-T498, M1-S497, M1-G496, M1-T495, M1-T494, M1-S493, M1-V492, M1-D491, M1-R490, M1-S489, M1-R488, M1-V487, M1-V486, M1-C485, M1-T484, M1-N483, M1-D482, M1-V481, M1-A480, M1-Y479, M1-A478, M1-G477, M1-L476, M1-V475, M1-H474, M1-S473, M1-T472, M1-G471, M1-P470, M1-L469, M1-A468, M1-S467, M1-C466, M1-G465, M1-T464, M1-L463, M1-T462, M1-W461, M1-G460, M1-E459, M1-E458, M1-C457, M1-A456, M1-V455, M1-T454, M1-V453, M1-Q452, M1-E451, M1-Q450, M1-P449, M1-A448, M1-P447, M1-I446, M1-G445, M1-H444, M1-E443, M1-K442, M1-V441, M1-K440, M1-C439, M1-E438, M1-L437, M1-G436, M1-P435, M1-A434, M1-H433, M1-C432, M1-C431, M1-S430, M1-A429, M1-H428, M1-I427, M1-S426, M1-A425, M1-E424, M1-R423, M1-H422, M1-G421, M1-V420, M1-C419, M1-Q418, M1-N417, M1-P416, M1-Q415, M1-G414, M1-R413, M1-P412, M1-R411, M1-L410, M1-V409, M1-P408, M1-P407, M1-K406, M1-H405, M1-T404, M1-G403, M1-L402, M1-D401, M1-E400, M1-V399, M1-E398, M1-W397, M1-H396, M1-S395, M1-S394, M1-C393, M1-G392, M1-T391, M1-L390, M1-V389, M1-H388, M1-G387, M1-Q386, M1-H385, M1-H384, M1-C383, M1-H382, M1-V381, M1-R380, M1-T379, M1-G378, M1-M377, M1-S376, M1-A375, M1-E374, M1-A373, M1-P372, M1-P371, M1-A370, M1-T369, M1-H368,

M1-V367, M1-S366, M1-C365, M1-N364, M1-A363, M1-Q362, M1-P361, M1-L360, M1-L359, M1-C358, M1-C357, M1-R356, M1-A355, M1-I354, M1-A353, M1-Y352, M1-V351, M1-G350, M1-E349, M1-G348, M1-G347, M1-F346, M1-A345, M1-N344, M1-H343, M1-A342, M1-R341, M1-C340, M1-V339, M1-L338, M1-K337, M1-G336, M1-G335, M1-Q334, M1-A333, M1-E332, M1-M331, M1-R330, M1-E329, M1-G328, M1-R327, M1-R326, M1-K325, M1-G324, M1-S323, M1-R322, M1-S321, M1-F320, M1-S319, M1-S318, M1-C317, M1-S316, M1-L315, M1-L314, M1-E313, M1-E312, M1-D311, M1-P310, M1-A309, M1-C308, M1-R307, M1-A306, M1-I305, M1-A304, M1-T303, M1-A302, M1-M301, M1-R300, M1-T299, M1-P298, M1-G297, M1-S296, M1-H295, M1-A294, M1-S293, M1-W292, M1-V291, M1-T290, M1-R289, M1-C288, M1-F287, M1-L286, M1-Q285, M1-W284, M1-G283, M1-A282, M1-G281, M1-H280, M1-T279, M1-S278, M1-P277, M1-P276, M1-L275, M1-A274, M1-A273, M1-V272, M1-L271, M1-N270, M1-P269, M1-T268, M1-L267, M1-V266, M1-R265, M1-Q264, M1-D263, M1-E262, M1-P261, M1-F260, M1-W259, M1-A258, M1-E257, M1-N256, M1-I255, M1-V254, M1-D253, M1-K252, M1-A251, M1-S250, M1-F249, M1-H248, M1-I247, M1-L246, M1-R245, M1-Q244, M1-R243, M1-L242, M1-E241, M1-A240, M1-L239, M1-T238, M1-L237, M1-E236, M1-P235, M1-E234, M1-A233, M1-S232, M1-L231, M1-M230, M1-M229, M1-A228, M1-A227, M1-I226, M1-G225, M1-A224, M1-V223, M1-H222, M1-A221, M1-A220, M1-A219, M1-Q218, M1-S217, M1-S216, M1-G215, M1-S214, M1-Q213, M1-S212, M1-V211, M1-F210, M1-C209, M1-T208, M1-S207, M1-C206, M1-D205, M1-S204, M1-S203, M1-A202, M1-G201, M1-I200, M1-I199, M1-D198, M1-E197, M1-G196, M1-P195, M1-A194, M1-F193, M1-L192, M1-D191, M1-V190, M1-C189, M1-R188, M1-G187, M1-F186, M1-N185, M1-T184, M1-G183, M1-L182, M1-T181, M1-G180, M1-L179, M1-T178, M1-V177, M1-P176, M1-Q175, M1-D174, M1-Q173, M1-A172, M1-N171, M1-T170, M1-A169, M1-G168, M1-V167, M1-T166, M1-I165, M1-V164, M1-E163, M1-P162, M1-A161, M1-S160, M1-A159, M1-P158, M1-S157, M1-Y156, M1-L155, M1-C154, M1-A153, M1-D152, M1-D151, M1-R150, M1-F149, M1-N148, M1-G147, M1-A146, M1-A145, M1-T144, M1-V143, M1-L142, M1-V141, M1-V140, M1-G139, M1-A138, M1-R137, M1-A136, M1-L135, M1-R134, M1-Q133, M1-C132, M1-A131, M1-A130, M1-N129, M1-L128, M1-V127, M1-R126, M1-S125, M1-Y124, M1-G123, M1-G122, M1-A121, M1-L120, M1-P119, M1-L118, M1-L117, M1-V116, M1-V115, M1-L114, M1-P113, M1-G112, M1-V111, M1-P110, M1-Q109, M1-V108, M1-L107, M1-Q106, M1-S105, M1-K104, M1-R103, M1-I102, M1-F101, M1-E100, M1-L99, M1-G98, M1-I97, M1-L96, M1-T95, M1-G94, M1-S93, M1-V92, M1-T91, M1-G90, M1-K89, M1-G88, M1-Q87, M1-C86, M1-N85, M1-L84, M1-V83, M1-R82, M1-L81, M1-S80, M1-R79, M1-M78, M1-S77, M1-A76, M1-G75, M1-K74, M1-A73, M1-V72, M1-G71, M1-A70, M1-D69, M1-R68, M1-G67, M1-S66, M1-V65, M1-V64, M1-G63, M1-A62, M1-L61, M1-H60, M1-T59, M1-G58, M1-H57, M1-S56, M1-D55, M1-C54, M1-K53, M1-S52, M1-A51, M1-Q50, M1-R49, M1-H48, M1-F47, M1-R46, M1-T45, M1-G44, M1-D43, M1-E42, M1-E41, M1-P40, M1-V39, M1-N38, M1-E37, M1-F36, M1-D35, M1-T34, M1-V33, M1-M32, M1-V31, M1-R30, M1-G29, M1-E28, M1-I27, M1-E26, M1-R25, M1-H24, M1-D23, M1-S22, M1-Q21, M1-I20, M1-S19, M1-T18, M1-D17, M1-L16, M1-L15, M1-Y14, M1-V13, M1-E12, M1-V11, M1-L10, M1-S9, M1-G8, y/o M1-G7 de SEC ID N°: 4. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento. Además, en el presente documento se describe un polipéptido que es al menos tan largo como cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9c de eliminación C-terminal pueden usarse como epítopos inmunogénicos y/o antigénicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden secuencias polipeptídicas que corresponden, por ejemplo, a regiones internas del polipéptido de PCSK9c (por ejemplo, cualquier combinación de eliminaciones tanto N-terminales como C-terminales del polipéptido de PCSK9c) de SEC ID N°: 4. Por ejemplo, las regiones internas pueden definirse mediante la ecuación: aminoácido NX hasta aminoácido CX, en el que NX se refiere a cualquier eliminación N-terminal de aminoácidos del polipéptido de PCSK9c (SEC ID N°: 4), y donde CX se refiere a cualquier eliminación C-terminal de aminoácidos del polipéptido de PCSK9c (SEC ID N°: 4). También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos. Estos polipéptidos pueden usarse como epítopo inmunogénico y/o antigénico, tal como se describe en otras partes del presente documento.

También se describen en el presente documento epítopos inmunogénicos y/o antigénicos del polipéptido de PCSK9c.

Muchas secuencias polinucleotídicas, tales como las secuencias EST, están públicamente disponibles y accesibles a través de bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEC ID N°: 3 y pueden haber estado públicamente disponibles antes de la concepción de la presente invención. Preferentemente, dichos polinucleótidos relacionados se excluyen específicamente del ámbito de la presente invención. Listar cada secuencia relacionada podría ser trabajo. Por consiguiente, se excluyen preferentemente de la presente invención uno o más polinucleótidos que consisten en una secuencia nucleotídica descrita por la fórmula general a-b, donde a es cualquier número entero entre 1 a 3742 de SEC ID N°: 3, b es un número entero entre 15 a 3756, donde ambos a y b corresponden a las posiciones de restos de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 3, y donde b es mayor o igual a a+14.

Características del polipéptido codificado por el polinucleótido N°: 3

Además, en el presente documento se describe un truncamiento N-terminal de PCSK9 (SEC ID N°: 5), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado la eliminación de una cantidad cualquiera entre aproximadamente 1 y aproximadamente 218 aminoácidos desde el extremo N-terminal de SEC ID N°: 5, y en el que el truncamiento N-terminal da como resultado actividad biológica de PCSK9 elevada, incluyendo, pero sin limitación, niveles de proteína LDLR disminuidos, y/o captación de LDL por LDLR disminuida. Los polinucleótidos que codifican truncamientos de PCSK9 se proporcionan como SEC ID N°: 38.

Los presentes inventores han sido los primeros en descubrir que los truncamientos en N-terminal de PCSK9 dan como resultado niveles elevados de actividad biológica de PCSK9. Dichas formas truncadas también facilitan en gran medida la identificación de moduladores de molécula pequeña de PCSK9 también. Se han efectuado experimentos diseñados para evaluar si el truncamiento del extremo N-terminal de PCSK9 da como resultado una actividad biológica elevada. Por ejemplo, el truncamiento del extremo N-terminal en 15 aminoácidos dio como resultado aumentos significativos de la actividad de PCSK9 (datos no mostrados), aunque no tan significativos como los observados para las variantes PCSK9b y PCSK9c (véanse las Figuras 9A-B). Además, PCSK9 toleró el truncamiento hasta un truncamiento de aproximadamente 218 aminoácidos, tras el cual se observaron niveles disminuidos de actividad biológica de PCSK9 (datos no mostrados).

Además, en el presente documento se describe un truncamiento N-terminal de PCSK9 (SEC ID N°: 5), en el que dicho truncamiento N-terminal da como resultado la eliminación de una cantidad cualquiera entre aproximadamente 1 y aproximadamente 218 aminoácidos desde el extremo N-terminal de SEC ID N°: 5, incluyendo, pero sin limitación, niveles disminuidos de proteína LDLR y/o captación disminuida de LDL por LDLR, y en el que dicha actividad biológica de PCSK9 elevada es al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 100 %, o más que la actividad biológica elevada de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 1, 2, 3, 4, o un 5 por ciento más o menos de la cantidad citada. Como alternativa, dicha actividad biológica elevada de PCSK9 puede ser al menos aproximadamente 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, o 10x más que la actividad biológica de PCSK9 de tipo silvestre. En este contexto, debe entenderse que el término "aproximadamente" significa cualquier valor entre un 0,1x, 0,2x, 0,3x, 0,4x, 0,5x, 0,6x, 0,7x, 0,8x, o 0,9x más o menos de la cantidad citada.

Preferentemente, un mutante de eliminación N-terminal de PCSK9 (SEC ID N°: 5) es de al menos aproximadamente 15 aminoácidos, pero de menos de aproximadamente 218 aminoácidos, de SEC ID N°: 5. Las formas truncadas de PCSK9 pueden crearse usando técnicas de biología molecular (véase el Ejemplo 13), escisión proteolítica, procesamiento postraduccional, síntesis química, etc., entre otros métodos conocidos en la técnica.

La región codificante de los polinucleótidos codificantes de PCSK9 se representa por los nucleótidos 292 a 2367 de SEC ID N°: 38.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9c N-terminales: M1-Q692, G2-Q692, T3-Q692, V4-Q692, S5-Q692, S6-Q692, R7-Q692, R8-Q692, S9-Q692, W10-Q692, W11-Q692, P12-Q692, L13-Q692, P14-Q692, L15-Q692, L16-Q692, L17-Q692, L18-Q692, L19-Q692, L20-Q692, L21-Q692, L22-Q692, L23-Q692, G24-Q692, P25-Q692, A26-Q692, G27-Q692, A28-Q692, R29-Q692, A30-Q692, Q31-Q692, E32-Q692, D33-Q692, E34-Q692, D35-Q692, G36-Q692, D37-Q692, Y38-Q692, E39-Q692, E40-Q692, L41-Q692, V42-Q692, L43-Q692, A44-Q692, L45-Q692, R46-Q692, S47-Q692, E48-Q692, E49-Q692, D50-Q692, G51-Q692, L52-Q692, A53-Q692, E54-Q692, A55-Q692, P56-Q692, E57-Q692, H58-Q692, G59-Q692, T60-Q692, T61-Q692, A62-Q692, T63-Q692, F64-Q692, H65-Q692, R66-Q692, C67-Q692, A68-Q692, K69-Q692, D70-Q692, P71-Q692, W72-Q692, R73-Q692, L74-Q692, P75-Q692, G76-Q692, T77-Q692, Y78-Q692, V79-Q692, V80-Q692, V81-Q692, L82-Q692, K83-Q692, E84-Q692, E85-Q692, T86-Q692, H87-Q692, L88-Q692, S89-Q692, Q90-Q692, S91-Q692, E92-Q692, R93-Q692, T94-Q692, A95-Q692, R96-Q692, R97-Q692, L98-Q692, Q99-Q692, A100-Q692, Q101-Q692, A102-Q692, A103-Q692, R104-Q692, R105-Q692, G106-Q692, Y107-Q692, L108-Q692, T109-Q692, K110-Q692, I111-Q692, L112-Q692, H113-Q692, V114-Q692, F115-Q692, H116-Q692, G117-Q692, L118-Q692, L119-Q692, P120-Q692, G121-Q692, F122-Q692, L123-Q692, V124-Q692, K125-Q692, M126-Q692, S127-Q692, G128-Q692, D129-Q692, L130-Q692, L131-Q692, E132-Q692, L133-Q692, A134-Q692, L135-Q692, K136-Q692, L137-Q692, P138-Q692, H139-Q692, V140-Q692, D141-Q692, Y142-Q692, I143-Q692, E144-Q692, E145-Q692, D146-Q692, S147-Q692, S148-Q692, V149-Q692, F150-Q692, A151-Q692, Q152-Q692, S153-Q692, I154-Q692, P155-Q692, W156-Q692, N157-Q692, L158-Q692, E159-Q692, R160-Q692, I161-Q692, T162-Q692, P163-Q692, P164-Q692, R165-Q692, Y166-Q692, R167-Q692, A168-Q692, D169-Q692, E170-Q692, Y171-Q692, Q172-Q692, P173-Q692, P174-Q692, D175-Q692, G176-Q692, G177-Q692, S178-Q692, L179-Q692, V180-Q692, E181-Q692, V182-Q692, Y183-Q692, L184-Q692, L185-Q692, D186-Q692, T187-Q692, S188-Q692, I189-Q692, Q190-Q692, S191-Q692, D192-Q692, H193-Q692, R194-Q692, E195-Q692, I196-Q692, E197-Q692, G198-Q692, R199-Q692, V200-Q692, M201-Q692, V202-Q692, T203-Q692, D204-Q692, F205-Q692, E206-Q692, N207-Q692, V208-Q692, P209-Q692, E210-Q692, E211-Q692, D212-Q692, G213-Q692, T214-Q692, R215-Q692, F216-Q692, H217-Q692, R218-Q692, Q219-Q692, A220-Q692, S221-Q692, K222-Q692, C223-Q692, D224-Q692, S225-Q692, H226-Q692, G227-Q692, T228-Q692, H229-Q692, L230-Q692, A231-Q692, G232-Q692, V233-Q692, S235-Q692, G236-Q692, R237-Q692, D238-Q692, A239-Q692, G240-Q692, V241-Q692, A242-Q692, K243-Q692, G244-Q692, A245-Q692, S246-Q692, M247-Q692, R248-Q692, S249-Q692, L250-Q692, R251-Q692, V252-Q692, L253-Q692, N254-Q692, C255-Q692, Q256-Q692, G257-Q692, K258-Q692, G259-Q692, T260-Q692, V261-Q692, S262-Q692, G263-Q692, T264-Q692, L265-Q692, I266-Q692, G267-Q692, L268-Q692, E269-Q692, F270-Q692, I271-Q692, R272-Q692, K273-Q692, S274-Q692, Q275-Q692, L276-Q692, V277-Q692, Q278-Q692, P279-Q692, V280-Q692, G281-Q692, P282-Q692, L283-Q692, V284-Q692, V285-Q692, L286-Q692, L287-Q692, P288-Q692, L289-Q692, A290-Q692, G291-Q692, G292-Q692, Y293-Q692, S294-Q692, R295-Q692, V296-Q692, L297-Q692, N298-Q692, A299-Q692, A300-Q692, C301-Q692, Q302-Q692, R303-Q692, L304-Q692, A305-Q692, R306-Q692, A307-Q692, G308-Q692, V309-Q692, V310-Q692, L311-Q692, V312-Q692, T313-Q692, A314-Q692, A315-Q692, G316-Q692, N317-Q692,

F318-Q692, R319-Q692, D320-Q692, D321-Q692, A322-Q692, C323-Q692, L324-Q692, Y325-Q692, S326-Q692, P327-Q692, A328-Q692, S329-Q692, A330-Q692, P331-Q692, E332-Q692, V333-Q692, I334-Q692, T335-Q692, V336-Q692, G337-Q692, A338-Q692, T339-Q692, N340-Q692, A341-Q692, Q342-Q692, D343-Q692, Q344-Q692, P345-Q692, V346-Q692, T347-Q692, L348-Q692, G349-Q692, T350-Q692, L351-Q692, G352-Q692, T353-Q692, N354-Q692, F355-Q692, G356-Q692, R357-Q692, C358-Q692, V359-Q692, D360-Q692, L361-Q692, F362-Q692, A363-Q692, P364-Q692, G365-Q692, E366-Q692, D367-Q692, I368-Q692, I369-Q692, G370-Q692, A371-Q692, S372-Q692, S373-Q692, D374-Q692, C375-Q692, S376-Q692, T377-Q692, C378-Q692, F379-Q692, V380-Q692, S381-Q692, Q382-Q692, S383-Q692, G384-Q692, T385-Q692, S386-Q692, Q387-Q692, A388-Q692, A389-Q692, A390-Q692, H391-Q692, V392-Q692, A393-Q692, G394-Q692, I395-Q692, A396-Q692, A397-Q692, M398-Q692, M399-Q692, L400-Q692, S401-Q692, A402-Q692, E403-Q692, P404-Q692, E405-Q692, L406-Q692, T407-Q692, L408-Q692, A409-Q692, E410-Q692, L411-Q692, R412-Q692, Q413-Q692, R414-Q692, L415-Q692, I416-Q692, H417-Q692, F418-Q692, S419-Q692, A420-Q692, K421-Q692, D422-Q692, V423-Q692, I424-Q692, N425-Q692, E426-Q692, A427-Q692, W428-Q692, F429-Q692, P430-Q692, E431-Q692, D432-Q692, Q433-Q692, R434-Q692, V435-Q692, L436-Q692, T437-Q692, P438-Q692, N439-Q692, L440-Q692, V441-Q692, A442-Q692, A443-Q692, L444-Q692, P445-Q692, P446-Q692, S447-Q692, T448-Q692, H449-Q692, G450-Q692, A451-Q692, G452-Q692, W453-Q692, Q454-Q692, L455-Q692, F456-Q692, C457-Q692, R458-Q692, T459-Q692, V460-Q692, W461-Q692, S462-Q692, A463-Q692, H464-Q692, S465-Q692, G466-Q692, P467-Q692, T468-Q692, R469-Q692, M470-Q692, A471-Q692, T472-Q692, A473-Q692, V474-Q692, A475-Q692, R476-Q692, C477-Q692, A478-Q692, P479-Q692, D480-Q692, E481-Q692, E482-Q692, L483-Q692, L484-Q692, S485-Q692, C486-Q692, S487-Q692, S488-Q692, F489-Q692, S490-Q692, R491-Q692, S492-Q692, G493-Q692, K494-Q692, R495-Q692, R496-Q692, G497-Q692, E498-Q692, R499-Q692, M500-Q692, E501-Q692, A502-Q692, Q503-Q692, G504-Q692, G505-Q692, K506-Q692, L507-Q692, V508-Q692, C509-Q692, R510-Q692, A511-Q692, H512-Q692, N513-Q692, A514-Q692, F515-Q692, G516-Q692, G517-Q692, E518-Q692, G519-Q692, V520-Q692, Y521-Q692, A522-Q692, I523-Q692, A524-Q692, R525-Q692, C526-Q692, C527-Q692, L528-Q692, L529-Q692, P530-Q692, Q531-Q692, A532-Q692, N533-Q692, C534-Q692, S535-Q692, V536-Q692, H537-Q692, T538-Q692, A539-Q692, P540-Q692, P541-Q692, A542-Q692, E543-Q692, A544-Q692, S545-Q692, M546-Q692, G547-Q692, T548-Q692, R549-Q692, V550-Q692, H551-Q692, C552-Q692, H553-Q692, Q554-Q692, Q555-Q692, G556-Q692, H557-Q692, V558-Q692, L559-Q692, T560-Q692, G561-Q692, C562-Q692, S563-Q692, S564-Q692, H565-Q692, W566-Q692, E567-Q692, V568-Q692, E569-Q692, D570-Q692, L571-Q692, G572-Q692, T573-Q692, H574-Q692, K575-Q692, P576-Q692, P577-Q692, V578-Q692, L579-Q692, R580-Q692, P581-Q692, R582-Q692, G583-Q692, Q584-Q692, P585-Q692, N586-Q692, Q587-Q692, C588-Q692, V589-Q692, G590-Q692, H591-Q692, R592-Q692, E593-Q692, A594-Q692, S595-Q692, I596-Q692, H597-Q692, A598-Q692, S599-Q692, C600-Q692, C601-Q692, H602-Q692, A603-Q692, P604-Q692, G605-Q692, L606-Q692, E607-Q692, C608-Q692, K609-Q692, V610-Q692, K611-Q692, E612-Q692, H613-Q692, G614-Q692, I615-Q692, P616-Q692, A617-Q692, P618-Q692, Q619-Q692, E620-Q692, Q621-Q692, V622-Q692, T623-Q692, V624-Q692, A625-Q692, C626-Q692, E627-Q692, E628-Q692, G629-Q692, W630-Q692, T631-Q692, L632-Q692, T633-Q692, G634-Q692, C635-Q692, S636-Q692, A637-Q692, L638-Q692, P639-Q692, G640-Q692, T641-Q692, S642-Q692, H643-Q692, V644-Q692, L645-Q692, G646-Q692, A647-Q692, Y648-Q692, A649-Q692, V650-Q692, D651-Q692, N652-Q692, T653-Q692, C654-Q692, V655-Q692, V656-Q692, R657-Q692, S658-Q692, R659-Q692, D660-Q692, V661-Q692, S662-Q692, T663-Q692, T664-Q692, G665-Q692, S666-Q692, T667-Q692, S668-Q692, E669-Q692, G670-Q692, A671-Q692, V672-Q692, T673-Q692, A674-Q692, V675-Q692, A676-Q692, I677-Q692, C678-Q692, C679-Q692, R680-Q692, S681-Q692, R682-Q692, H683-Q692, L684-Q692, A685-Q692, y/o Q686-Q692 de SEC ID N°: 5. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento como SEC ID N°: 38. Además, en el presente documento se describen polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos tan largo como uno cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9c de eliminación N-terminal pueden usarse como epítomos inmunogénicos y/o antigénicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

También se describen en el presente documento polinucleótidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia que codifica los siguientes polipéptidos de eliminación de PCSK9c C-terminales: M1-Q692, M1-L691, M1-E690, M1-Q689, M1-S688, M1-A687, M1-Q686, M1-A685, M1-L684, M1-H683, M1-R682, M1-S681, M1-R680, M1-C679, M1-C678, M1-1677, M1-A676, M1-V675, M1-A674, M1-T673, M1-V672, M1-A671, M1-G670, M1-E669, M1-S668, M1-T667, M1-S666, M1-G665, M1-T664, M1-T663, M1-S662, M1-V661, M1-D660, M1-R659, M1-S658, M1-R657, M1-V656, M1-V655, M1-C654, M1-T653, M1-N652, M1-D651, M1-V650, M1-A649, M1-Y648, M1-A647, M1-G646, M1-L645, M1-V644, M1-H643, M1-S642, M1-T641, M1-G640, M1-P639, M1-L638, M1-A637, M1-S636, M1-C635, M1-G634, M1-T633, M1-L632, M1-T631, M1-W630, M1-G629, M1-E628, M1-E627, M1-C626, M1-A625, M1-V624, M1-T623, M1-V622, M1-Q621, M1-E620, M1-Q619, M1-P618, M1-A617, M1-P616, M1-I615, M1-G614, M1-H613, M1-E612, M1-K611, M1-K609, M1-C608, M1-E607, M1-L606, M1-G605, M1-P604, M1-A603, M1-H602, M1-C601, M1-C600, M1-S599, M1-A598, M1-H597, M1-I596, M1-S595, M1-A594, M1-E593, M1-R592, M1-H591, M1-G590, M1-V589, M1-C588, M1-Q587, M1-N586, M1-P585, M1-Q584, M1-G583, M1-R582, M1-P581, M1-R580, M1-L579, M1-V578, M1-P577, M1-P576, M1-K575, M1-H574, M1-T573, M1-G572, M1-L571, M1-D570, M1-E569, M1-V568, M1-E567, M1-W566, M1-H565, M1-S564, M1-S563, M1-C562, M1-G561, M1-T560, M1-L559, M1-V558, M1-H557, M1-G556, M1-Q555, M1-Q554, M1-H553, M1-C552, M1-H551, M1-V550, M1-R549, M1-T548, M1-G547, M1-M546, M1-S545, M1-A544, M1-E543, M1-A542, M1-P541, M1-P540, M1-A539, M1-T538, M1-H537, M1-V536, M1-S535, M1-C534, M1-N533, M1-A532, M1-Q531, M1-P530, M1-L529, M1-L528, M1-C527, M1-C526, M1-R525, M1-A524, M1-I523, M1-A522, M1-Y521, M1-V520, M1-G519, M1-E518, M1-G517, M1-G516, M1-F515, M1-A514, M1-N513, M1-H512, M1-A511, M1-R510, M1-C509, M1-V508, M1-L507, M1-K506, M1-G505, M1-G504,

5 M1-Q503, M1-A502, M1-E501, M1-M500, M1-R499, M1-E498, M1-G497, M1- R496, M1-R495, M1-K494, M1-G493, M1-S492, M1-R491, M1-S490, M1-F489, M1-S488, M1-S487, M1-C486, M1- S485, M1-L484, M1-L483, M1-E482, M1-E481, M1-D480, M1-P479, M1-A478, M1-C477, M1-R476, M1-A475, M1-V474, M1-A473, M1-T472, M1-A471, M1-M470, M1-R469, M1-T468, M1-P467, M1-G466, M1-S465, M1-H464, M1-A463, M1- S462, M1-W461, M1-V460, M1-T459, M1-R458, M1-C457, M1-F456, M1-L455, M1-Q454, M1-W453, M1-G452, M1- A451, M1-G450, M1-H449, M1-T448, M1-S447, M1-P446, M1-P445, M1-L444, M1-A443, M1-A442, M1-V441, M1-L440, M1-N439, M1-P438, M1-T437, M1-L436, M1-V435, M1-R434, M1-Q433, M1-D432, M1-E431, M1-P430, M1-F429, M1- W428, M1-A427, M1-E426, M1-N425, M1-I424, M1-V423, M1-D422, M1-K421, M1-A420, M1-S419, M1-F418, M1-H417, M1-I416, M1-L415, M1-R414, M1-Q413, M1-R412, M1-L411, M1-E410, M1-A409, M1-L408, M1-T407, M1-L406, M1- E405, M1-P404, M1-E403, M1-A402, M1-S401, M1-L400, M1-M399, M1-M398, M1-A397, M1-A396, M1-I395, M1-G394, M1-A393, M1-V392, M1-H391, M1-A390, M1-A389, M1-A388, M1-Q387, M1-S386, M1-T385, M1-G384, M1-S383, M1- Q382, M1-S381, M1-V380, M1-F379, M1-C378, M1-T377, M1-S376, M1-C375, M1-D374, M1-S373, M1-S372, M1- A371, M1-G370, M1-I369, M1-I368, M1-D367, M1-E366, M1-G365, M1-P364, M1-A363, M1-F362, M1-L361, M1-D360, M1-V359, M1-C358, M1-R357, M1-G356, M1-F355, M1-N354, M1-T353, M1-G352, M1-L351, M1-T350, M1-G349, M1- L348, M1-T347, M1-V346, M1-P345, M1-Q344, M1-D343, M1-Q342, M1-A341, M1-N340, M1-T339, M1-A338, M1- G337, M1-V336, M1-T335, M1-I334, M1-V333, M1-E332, M1-P331, M1-A330, M1-S329, M1-A328, M1-P327, M1-S326, M1-Y325, M1-L324, M1-C323, M1-A322, M1-D321, M1-D320, M1-R319, M1-F318, M1-N317, M1-G316, M1-A315, M1- A314, M1-T313, M1-V312, M1-L311, M1-V310, M1-V309, M1-G308, M1-A307, M1-R306, M1-A305, M1-L304, M1-R303, M1-Q302, M1-C301, M1-A300, M1-A299, M1-N298, M1-L297, M1-V296, M1-R295, M1-S294, M1-Y293, M1-G292, M1- G291, M1-A290, M1-L289, M1-P288, M1-L287, M1-L286, M1-V285, M1-V284, M1-L283, M1-P282, M1-G281, M1-V280, M1-P279, M1-Q278, M1-V277, M1-L276, M1-Q275, M1-S274, M1-K273, M1-R272, M1-I271, M1-F270, M1-E269, M1- L268, M1-G267, M1-I266, M1-L265, M1-T264, M1-G263, M1-S262, M1-V261, M1-T260, M1-G259, M1-K258, M1-G257, M1-Q256, M1-C255, M1-N254, M1-L253, M1-V252, M1-R251, M1-L250, M1-S249, M1-R248, M1-M247, M1-S246, M1- A245, M1-G244, M1-K243, M1-A242, M1-V241, M1-G240, M1-A239, M1-D238, M1-R237, M1-G236, M1-S235, M1- V234, M1-V233, M1-G232, M1-A231, M1-L230, M1-H229, M1-T228, M1-G227, M1-H226, M1-S225, M1-D224, M1- C223, M1-K222, M1-S221, M1-A220, M1-Q219, M1-R218, M1-H217, M1-F216, M1-R215, M1-T214, M1-G213, M1- D212, M1-E211, M1-E210, M1-P209, M1-V208, M1-N207, M1-E206, M1-F205, M1-D204, M1-T203, M1-V202, M1- M201, M1-V200, M1-R199, M1-G198, M1-E197, M1-I196, M1-E195, M1-R194, M1-H193, M1-D192, M1-S191, M1- Q190, M1-I189, M1-S188, M1-T187, M1-D186, M1-L185, M1-L184, M1-Y183, M1-V182, M1-E181, M1-V180, M1-L179, M1-S178, M1-G177, M1-G176, M1-D175, M1-P174, M1-P173, M1-Q172, M1-Y171, M1-E170, M1-D169, M1-A168, M1- R167, M1-Y166, M1-R165, M1-P164, M1-P163, M1-T162, M1-I161, M1-R160, M1-E159, M1-L158, M1-N157, M1-W156, M1-P155, M1-I154, M1-S153, M1-Q152, M1-A151, M1-F150, M1-V149, M1-S148, M1-S147, M1-D146, M1-E145, M1- E144, M1-I143, M1-Y142, M1-D141, M1-V140, M1-H139, M1-P138, M1-L137, M1-K136, M1-L135, M1-A134, M1-L133, M1-E132, M1-L131, M1-L130, M1-D129, M1-G128, M1-S127, M1-M126, M1-K125, M1-V124, M1-L123, M1-F122, M1- G121, M1-P120, M1-L119, M1-L118, M1-G117, M1-H116, M1-F115, M1-V114, M1-H113, M1-L112, M1-I111, M1-K110, M1-T109, M1-L108, M1-Y107, M1-G106, M1-R105, M1-R104, M1-A103, M1-A102, M1-Q101, M1-A100, M1-Q99, M1- L98, M1-R97, M1-R96, M1-A95, M1-T94, M1-R93, M1-E92, M1-S91, M1-Q90, M1-S89, M1-L88, M1-H87, M1-T86, M1- E85, M1-E84, M1-K83, M1-L82, M1-V81, M1-V80, M1-V79, M1-Y78, M1-T77, M1-G76, M1-P75, M1-L74, M1-R73, M1- W72, M1-P71, M1-D70, M1-K69, M1-A68, M1-C67, M1-R66, M1-H65, M1-F64, M1-T63, M1-A62, M1-T61, M1-T60, M1- G59, M1-H58, M1-E57, M1-P56, M1-A55, M1-E54, M1-A53, M1-L52, M1-G51, M1-D50, M1-E49, M1-E48, M1-S47, M1- R46, M1-L45, M1-A44, M1-L43, M1-V42, M1-L41, M1-E40, M1-E39, M1-Y38, M1-D37, M1-G36, M1-D35, M1-E34, M1- D33, M1-E32, M1-Q31, M1-A30, M1-R29, M1-A28, M1-G27, M1-A26, M1-P25, M1-G24, M1-L23, M1-L22, M1-L21, M1- L20, M1-L19, M1-L18, M1-L17, M1-L16, M1-L15, M1-P14, M1-L13, M1-P12, M1-W11, M1-W10, M1-S9, M1-R8, y/o M1-R7 de SEC ID N°: 5. Las secuencias polipeptídicas codificadas por estos polinucleótidos también se describen en el presente documento como SEC ID N°: 38. Además, en el presente documento se describen polinucleótidos que codifican un polipéptido que es al menos tan largo como uno cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados. Estos polipéptidos de PCSK9c de eliminación C-terminal pueden usarse como epítopos inmunogénicos y/o antígenicos tal como se describen en otras partes del presente documento.

TABLA I

Gen N°	ID de clon de ADNc	N° de depósito ATCC®: Z y Fecha	Vector	SEC ID N°: X NT	Total de Sec NT de clon	5' NT de codon de inicio de ORF	3' NT de ORF	AA de SEC ID N°: Y	Total de AA de ORF
1.	PCSK9b (también citado como PCSK9-b)	PTA-7622 10/05/06	pSPORT2	1	3175	250	1194	2	315
2.	PCSK9c (también citado como PCSK9-c)	PTA-7622 10/05/06	pSPORT1	3	3756	881	2449	4	523

La Tabla I resume la información correspondiente a cada "N° de gen" descrito anteriormente. La secuencia nucleotídica identificada como "NT SEC ID N°: X" se ensambló a partir de secuencias parcialmente homólogas ("solapantes") obtenidas de la "ID de clon ADNc" identificadas en la Tabla I y, en algunos casos, a partir de clones de

ADN relacionados adicionales. Las secuencias solapantes se ensamblaron en una sola secuencia contigua de elevada redundancia (normalmente varias secuencias solapantes en cada posición de nucleótido), dando como resultado una secuencia final identificada como SEC ID N°: X.

- 5 La ID de clon de ADNc se depositó en la fecha y se le asignó el correspondiente número de depósito listado en "N° de depósito ATCC®: Z y Fecha". "Vector" se refiere al tipo de vector contenido en la ID de clon de ADNc.

"Total de SEC NT de clon" se refiere al número total de nucleótidos en el cóntigo de clon identificado por "N° de gen". El clon depositado puede contener la totalidad o la mayoría de la secuencia de SEC ID N°: X. La posición de nucleótido de SEC ID N°: X del codon de inicio putativo (metionina) se identifica como "5' NT de codon de inicio de ORF".

10 La secuencia de aminoácidos traducida, que comienza en la metionina, se identifica como "AA de SEC ID N°: Y" aunque pueden traducirse fácilmente otros marcos de lectura usando técnicas de biología molecular conocidas. Los polipéptidos producidos por estos marcos de lectura abiertos alternativos se contemplan específicamente en la presente invención.

15 El número total de aminoácidos en el marco de lectura abierto de SEC ID N°: Y se identifica como "Total de AA de ORF".

20 SEC ID N°: X (donde X puede ser cualquiera de las secuencias polinucleotídicas divulgadas en el listado de secuencia) y la SEC ID N°: Y traducida (donde Y puede ser cualquiera de las secuencias polipeptídicas divulgadas en el listado de secuencias) son lo suficientemente precisas y de otro modo adecuadas para diversos usos bien conocidos en la técnica y descritos adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, SEC ID N°: X es útil para diseñar sondas de hibridación de ácido nucleico que detectarán secuencias de ácido nucleico contenidas en SEC ID N°: X del ADNc contenido en el clon depositado. Estas sondas también hibridarán con moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, permitiendo de este modo diversos métodos forenses y diagnósticos de la invención. De manera similar, pueden usarse los polipéptidos identificados a partir de SEC ID N°: Y, por ejemplo, para generar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas que contienen los polipéptidos y las proteínas codificadas por los clones de ADNc identificados en la Tabla I.

30 Sin embargo, las secuencias de ADN generadas mediante reacciones de secuenciación pueden contener errores de secuenciación. Los errores existen como nucleótidos mal identificados, o como inserciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de ADN generada. Los nucleótidos insertados o eliminados erróneamente pueden causar desplazamientos de marco en los marcos de lectura de la secuencia de aminoácidos predicha. En estos casos, la secuencia de aminoácidos predicha difiere de la secuencia de aminoácidos real, aunque la secuencia de ADN generada pueda ser idéntica en más de un 99,9 % con la secuencia de ADN real (por ejemplo, una inserción o eliminación de bases en un marco de lectura abierto de más de 1000 bases).

40 Por consiguiente, para aquellas aplicaciones que requieran precisión en la secuencia nucleotídica o en la secuencia aminoacídica, la presente invención proporciona no solo la secuencia nucleotídica generada identificada como SEC ID N°: X y la secuencia aminoacídica predicha traducida identificada como SEC ID N°: Y, sino también una muestra de ADN de plásmido que contiene un ADNc de la invención depositado en la ATCC®, tal como se expone en la Tabla I. La secuencia nucleotídica de cada clon depositado puede determinarse fácilmente secuenciando el clon depositado de acuerdo con métodos conocidos. La secuencia aminoacídica predicha puede por lo tanto verificarse a partir de dichos depósitos. Además, la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por un clon particular también puede determinarse directamente mediante secuenciación de péptidos o expresando la proteína en una célula hospedadora adecuada que contiene el ADNc depositado, recogiendo la proteína, y determinando su secuencia.

50 La presente invención también se refiere a los genes que corresponden a SEC ID N°: X, SEC ID N°: Y, o al clon depositado. El gen correspondiente puede aislarse de acuerdo con métodos conocidos usando la información de secuencia divulgada en el presente documento. Dichos métodos incluyen preparar sondas o cebadores a partir de la secuencia divulgada e identificar o amplificar el gen correspondiente a partir de fuentes adecuadas de material genómico.

55 En el presente documento también se describen homólogos de especie, variantes alélicas, y/o ortólogos. El experto en la materia podría, usando procedimientos bien conocidos en la técnica, obtener la secuencia polinucleotídica correspondiente a genes de longitud completa (incluyendo, pero sin limitación, la región codificante de longitud completa), variantes alélicas, variantes de corte y empalme, ortólogos, y/o homólogos de especie de genes correspondientes a SEC ID N°: X, SEC ID N°: Y, o a un clon depositado, basándose en la secuencia de las secuencias divulgadas en el presente documento o de los clones depositados en la ATCC®. Por ejemplo, pueden aislarse e identificarse variantes alélicas y/o homólogos de especie preparando sondas o cebadores adecuados que corresponden a las regiones 5', 3', o internas de las secuencias proporcionadas en el presente documento y explorar una fuente de ácido nucleico adecuada en busca de variantes alélicas y/o del homólogo deseado.

65 Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos aislados de origen natural, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos de

manera sintética, o polipéptidos producidos mediante una combinación de estos métodos. Los medios para preparar dichos polipéptidos se entienden bien en la técnica.

Los polipéptidos pueden estar en forma de la proteína, o pueden ser una parte de una proteína mayor, tal como una proteína de fusión (véase más adelante). A menudo es ventajoso incluir una secuencia aminoacídica adicional que contiene secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayudan a la purificación, tales como múltiples restos de histidina, o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante.

Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferentemente en forma aislada, y preferentemente están sustancialmente purificados. Una versión de un polipéptido producida de manera recombinante puede purificarse sustancialmente usando técnicas descritas en el presente documento o de otro modo conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, el método en un solo paso descrito en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988). Los polipéptidos de la invención también pueden purificarse a partir de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes usando protocolos descritos en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, anticuerpos de la invención provocados contra la forma de longitud completa de la proteína.

La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende, o como alternativa consisten en, la secuencia identificada como SEC ID N°: X, y/o un ADNc proporcionado en el N° de depósito ATCC® Z. La presente invención también proporciona un polipéptido que comprende, o como alternativa consisten en, la secuencia identificada como SEC ID N°: Y, y/o un polipéptido codificado por el ADNc proporcionado en el N° de depósito ATCC® Z. La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende, o como alternativa consiste en la secuencia polipeptídica de SEC ID N°: Y, y/o una secuencia polipeptídica codificada por el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC® Z.

Preferentemente, la presente invención se dirige a un polinucleótido que comprende, o como alternativa consiste en, la secuencia identificada como SEC ID N°: X, y/o un ADNc proporcionado en el N° de depósito ATCC® Z. que es menor que, o igual a, una secuencia polinucleotídica que tiene 5 mega pares de bases, 1 mega par de bases, 0,5 mega par de bases, 0,1 mega par de bases, 50.000 pares de bases, 20.000 pares de bases, o 10.000 pares de bases de longitud.

La presente invención abarca polinucleótidos con secuencias complementarias a aquellas de los polinucleótidos de la presente invención divulgados en el presente documento. Dichas secuencias pueden ser complementarias a la secuencia divulgada como SEC ID N°: X, a la secuencia contenida en un depósito, y/o a la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia divulgada como SEC ID N°: Y.

La presente invención también abarca polinucleótidos capaces de hibridar, preferentemente en condiciones de rigurosidad reducida, más preferentemente en condiciones rigurosas, y lo más preferentemente en condiciones de alta rigurosidad, con polinucleótidos divulgados en el presente documento. Los ejemplos de condiciones de rigurosidad se muestran en la Tabla II a continuación: las condiciones altamente rigurosas son aquellas 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.

TABLA II

Condición de rigurosidad	Híbrido de polinucleótido±	Longitud de híbrido (pb)‡	Temperatura y tampón de hibridación †	Temperatura y tampón de lavado †
A	ADN:ADN	> o igual a 50	65 °C; SSC 1x -o- 42 °C; SSC 1x, formamida al 50 %	65 °C; SSC 0,3x
B	ADN:ADN	< 50	Tb*; SSC 1x	Tb*; SSC 1x
C	ADN:ARN	> o igual a 50	67 °C; SSC 1x -o- 45 °C; SSC 1x, formamida al 50 %	67 °C; SSC 0,3x
D	ADN:ARN	< 50	Td*; SSC 1x	Td*; SSC 1x
E	ARN:ARN	> o igual a 50	70 °C; SSC 1x -o- 50 °C; SSC 1x, formamida al 50 %	70 °C; SSC 0,3x
F	ARN:ARN	< 50	Tf*; SSC 1x	Tf*; SSC 1x
G	ADN:ADN	> o igual a 50	65 °C; SSC 4x -o- 45 °C; SSC 4x, formamida al 50 %	65 °C; SSC 1x
H	ADN:ADN	< 50	Th*; SSC 4x	Th*; SSC 4x

I	ADN:ARN	> o igual a 50	67 °C; SSC 4x -o- 45 °C; SSC 4x, formamida al 50 %	67 °C; SSC 1x
J	ADN:ARN	< 50	Tj*; SSC 4x	Tj*; SSC 4x
K	ARN:ARN	> o igual a 50	70 °C; SSC 4x -o- 40 °C; SSC 6x, formamida al 50 %	67 °C; SSC 1x
L	ARN:ARN	< 50	Tl*; SSC 2x	Tl*; SSC 2x
M	ADN:ADN	> o igual a 50	50 °C; SSC 4x -o- 40 °C SSC 6x, formamida al 50 %	50 °C; SSC 2x
N	ADN:ADN	< 50	Tn*; SSC 6x	Tn*; SSC 6x
O	ADN:ARN	> o igual a 50	55 °C; SSC 4x -o- 42 °C; SSC 6x, formamida al 50 %	55 °C; SSC 2x
P	ADN:ARN	< 50	Tp*; SSC 6x	Tp*; SSC 6x
Q	ARN:ARN	> o igual a 50	60 °C; SSC 4x -o- 45 °C; SSC 6x, formamida al 50 %	60 °C; SSC 2x
R	ARN:ARN	< 50	Tr*; SSC 4x	Tr*; SSC 4x

‡ - La "longitud del híbrido" es la longitud anticipada para las regiones hibridadas de los polinucleótidos hibridantes. Cuando se hibrida un polinucleótido de secuencia desconocida, se asume que el híbrido es el del polinucleótido hibridante de la presente invención. Cuando se hibridan polinucleótidos de secuencia conocida, la longitud del híbrido puede determinarse alineando las secuencias de los polinucleótidos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima. Se conocen bien en la técnica los métodos para alinear dos o más secuencias polinucleotídicas y/o determinar la identidad porcentual entre dos secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, el programa MegAlign del paquete de programas DNASTAR®, etc.).

† - SSPE (SSPE 1x es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM, y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse con SSC (SSC 1x es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de hibridación y lavado; los lavados se llevan a cabo 15 minutos después de completar la hibridación. Las hibridaciones y lavados pueden incluir adicionalmente reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5 - 1,0 %, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, pirofosfato de sodio al 0,5 %, y formamida hasta el 50 %.

*Tb - Tr: La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que tienen menos de 50 pares de bases de longitud debe ser 5-10 °C menos que la temperatura de fusión T_m de los híbridos, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para los híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(N^{\circ} \text{ de bases de A + T}) + 4(N^{\circ} \text{ de bases de G + C})$. Para los híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{G+C}) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na⁺] para SSC 1x = 0,165 M).

± - La presente invención abarca la sustitución de uno cualquiera o más de los compañeros híbridos de ADN o ARN con bien un APN o un polinucleótido modificado. Dichos polinucleótidos modificados se conocen en la técnica y se describen más particularmente en otras partes del presente documento.

Los ejemplos adicionales de condiciones de rigurosidad para hibridación de polinucleótidos se proporcionan, por ejemplo, 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 and Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4.

Preferentemente, dichos polinucleótidos hibridantes tienen al menos un 70 % de identidad de secuencia (más preferentemente, al menos un 80 % de identidad; y lo más preferentemente al menos un 90 % o 95 % de identidad) con el polinucleótido de la presente invención con el que hibridan, determinándose la identidad de secuencia comparando las secuencias de los polinucleótidos hibridantes cuando se alinean para maximizar el solapamiento y la identidad a la vez que se minimizan los huecos de secuencia. La determinación de la identidad se conoce bien en la técnica, y se discute más específicamente en otras partes del presente documento.

La invención abarca la aplicación de metodología de la PCR a las secuencias polinucleotídicas de la presente invención, al clon depositado en la ATCC® y/o al ADNc que codifica los polipéptidos de la presente invención. Las técnicas de la PCR para la amplificación de ácidos nucleicos se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.683.195 y en Saiki et al., Science, 239:487-491 (1988). La PCR, por ejemplo, puede incluir las siguientes etapas de desnaturalización del ácido nucleico molde (si es bicatenario), hibridación del cebador a la diana, y polimerización. El ácido nucleico sondado o usado como molde en la reacción de amplificación puede ser ADN genómico, ADNc, ARN, o un APN. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas a partir de ADN genómico, de una secuencia de ARN específica, y/o de ADNc transcrito a partir de ARNm. Las referencias para el uso general de técnicas PCR, incluyendo parámetros específicos del método, incluyen Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51:263,

(1987), Ehrlich (ed), PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989; Ehrlich et al., Science, 252:1643-1650, (1991); y "PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications", Eds., Innis et al., Academic Press, Nueva York, (1990).

Variantes polinucleotídicas y polipeptídicas

5 En el presente documento también se describen variantes (por ejemplo, variantes alélicas, ortólogos, etc.) de la secuencia polinucleotídica divulgada en el presente documento en la SEC ID N°: X, en la hebra complementaria de la misma, y/o en la secuencia de ADNc contenida en el clon depositado.

10 En el presente documento también se describen variantes de la secuencia polipeptídica, y/o fragmentos de la misma, divulgados en la SEC ID N°: Y, en un polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica en SEC ID N°: X, y/o en un polipéptido codificado por un ADNc en el clon depositado.

15 Una "variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido de la presente invención, pero que retiene las propiedades esenciales del mismo. En general, las variantes son muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido de la presente invención.

Por lo tanto, en el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o como alternativa consisten en, un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene la secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (c) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento biológicamente activo del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica mostrada en el listado de secuencias y descrita en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (d) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento antigénico del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica mostrada en el listado de secuencias y descrita en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (e) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que comprende la secuencia aminoacídica completa codificada por un plásmido de ADNc humano contenida en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (f) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un plásmido de ADNc humano contenida en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (g) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un plásmido de ADNc humano contenida en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; (h) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento antigénico de un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un plásmido de ADNc humano contenida en SEC ID N°: X o el ADNc contenido en el N° de depósito ATCC®: Z; e (i) una secuencia nucleotídica complementaria con cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h), anteriores.

En el presente documento se describen secuencias polinucleotídicas que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia polinucleotídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 93,6 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o un 99,9 % idéntica a, por ejemplo, cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h), anteriores. Además, en el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden, o como alternativa, consisten en un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas, o como alternativa, en condiciones de menor rigurosidad, con un polinucleótido en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h), anteriores. En el presente documento también se describen polinucleótidos que hibridan con el complemento de estas moléculas de ácido nucleico en condiciones rigurosas de hibridación o, como alternativa, en condiciones de menor rigurosidad, al igual que polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

Además, en el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o como alternativa, que consiste en, un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en la Tabla I; (b) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene la secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en la Tabla I; (c) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en la Tabla I; (d) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento antigénico de un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica tal como se muestra en el listado de secuencias y descrita en la Tabla I; (e) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que comprende la secuencia aminoacídica completa codificada por un ADNc humano en un plásmido de ADNc contenido en el depósito de la ATCC® y descrito en la Tabla I; (f) una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido maduro de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un ADNc

humano en un plásmido de ADNc contenido en el depósito de la ATCC® y descrito en la Tabla I; (g) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un ADNc humano en un plásmido de ADNc contenido en el depósito de la ATCC® y descrito en la Tabla I; (h) una secuencia nucleotídica que codifica un fragmento antigénico de un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que tiene una secuencia aminoacídica completa codificada por un ADNc humano en un plásmido de ADNc contenido en el depósito de la ATCC® y descrito en la Tabla I; e (i) una secuencia nucleotídica complementaria con cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h) anteriores.

En el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden, o como alternativa, consisten en una secuencia nucleotídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o un 99,9 % idéntica a, por ejemplo, cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h), anteriores.

En el presente documento se describen secuencias polipeptídicas que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia aminoacídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o un 99,9 % idéntica a, los siguientes ejemplos no limitantes, la secuencia polipeptídica identificada como SEC ID N°: Y, la secuencia polipeptídica codificada por un ADNc proporcionado en el clon depositado, y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de los polipéptidos proporcionados en el presente documento. Además, en el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico que comprenden, o como alternativa, consisten en un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas, o como alternativa, en condiciones de menor rigurosidad, con un polinucleótido en (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), o (h), anteriores. En el presente documento también se describen polinucleótidos que hibridan con el complemento de estas moléculas de ácido nucleico en condiciones rigurosas de hibridación o, como alternativa, en condiciones de menor rigurosidad, al igual que polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

Además, En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia aminoacídica que es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o un 99,9 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEC ID N°: Y, una secuencia polipeptídica codificada por la secuencia nucleotídica en SEC ID N°: X, una secuencia polipeptídica codificada por el ADNc en el plásmido de ADNc:Z, y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, aquellos fragmentos descritos en el presente documento). En el presente documento también se describen polinucleótidos que hibridan con el complemento de las moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos en condiciones de hibridación rigurosas o, como alternativa, en condiciones de menor rigurosidad, al igual que polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

Por un ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia nucleotídica de referencia de la presente invención, se entiende que la secuencia nucleotídica del ácido nucleico sea idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia nucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia del nucleótido de referencia que codifica al polipéptido. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tenga una secuencia nucleotídica al menos un 95 % idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, hasta el 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse con otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. La secuencia de búsqueda puede ser una secuencia completa citada en la Tabla I, el ORF (marco de lectura abierto), o cualquier fragmento especificado tal como se describe en el presente documento.

Como aspecto particular, puede determinarse si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 % idéntica a una secuencia nucleotídica de la presente invención de manera convencional usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia general entre una secuencia de búsqueda (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también citado como alineamiento de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático CLUSTALW (Thompson, J.D., et al., *Nucleic Acids Research*, 2(22):4673-4680, (1994)), que se basa en el algoritmo de Higgins, D.G., et al., *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 8(2):189-191, (1992). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de búsqueda y objeto son ambas secuencias de ADN. Puede compararse una secuencia de ARN convirtiendo las U en T. Sin embargo, el algoritmo CLUSTALW convierte automáticamente las U a T cuando se comparan secuencias de ARN con secuencias de ADN. El resultado de dicho alineamiento global de secuencia se expresa en identidad porcentual. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento de secuencias de ADN CLUSTALW para calcular la identidad porcentual mediante alineamiento por pares son: Matriz = IUB, k-tuple = 1, Número de diagonales máximas = 5, Penalización por hueco = 3, Penalización por hueco abierto = 10, Penalización por extensión de hueco = 0,1, Método de puntuación = Porcentual, Tamaño de ventana = 5 o la longitud de la secuencia nucleotídica objeto, la que sea más corta. Para alineamientos múltiples, se prefieren los siguientes parámetros de CLUSTALW: Penalización por apertura de hueco = 10; Parámetro de extensión de hueco = 0,05; Intervalo de penalización por separación de hueco = 8; Penalización por separación de hueco final =

Desactivado; % de identidad para retraso de alineamiento = 40 %; Restos específicos de huecos: Desactivado; Hueco de esto hidrófilo = Desactivado; y ponderación de transición = 0. Los parámetros de alineamiento por parejas y múltiple anteriores proporcionados para CLUSTALW representan los parámetros por defecto proporcionados con el programa informático ALIGNX® (paquete de programas VECTOR NTI®, versión 6.0).

Puede aplicarse una corrección manual a los resultados de identidad porcentual en caso de que la secuencia objeto sea más corta que la secuencia de búsqueda debido a eliminaciones 5' o 3', no debido a eliminaciones internas. Solo se necesita el porcentaje de identidad por pares, no es necesaria la corrección manual. Sin embargo, puede aplicarse una corrección manual para determinar la identidad porcentual global a partir de un alineamiento de polinucleótido global. Los cálculos de identidad porcentual basados en alineamientos de polinucleótidos globales se prefieren a menudo ya que reflejan la identidad porcentual entre las moléculas de polinucleótido de manera global (es decir, incluyendo cualquier saliente de polinucleótido, no solo las regiones solapantes), en oposición a solo polinucleótidos coincidentes locales. Se necesitan correcciones manuales para las determinaciones de identidad porcentual global ya que el programa CLUSTALW no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia objeto cuando se calcula la identidad porcentual. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', en relación a la secuencia de búsqueda, la identidad porcentual se corrige calculando el número de bases de la secuencia de búsqueda que se encuentran en 5' y 3' de la secuencia objeto, que no se encuentran emparejadas/alineadas, como el tanto por ciento de las bases totales de la secuencia de búsqueda. Se determina si un nucleótido está emparejado/alineado mediante los resultados del alineamiento de secuencias de CLUSTALW. Este porcentaje se resta posteriormente de la identidad porcentual, calculada mediante el programa CLUSTALW anterior usando los parámetros especificados, para obtener una puntuación de identidad porcentual final. Esta puntuación corregida puede usarse para los fines de la presente invención. Solo se calculan las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia objeto, mostradas mediante el alineamiento de CLUSTALW, que no están emparejadas/alineadas con la secuencia de búsqueda con el fin de ajustar manualmente la puntuación de identidad porcentual.

Por ejemplo, se alinea una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de búsqueda de 100 bases para determinar la identidad porcentual. Las eliminaciones suceden en el extremo 5' de la secuencia objeto y por lo tanto, el alineamiento CLUSTALW no muestra un emparejamiento/alineamiento de las 10 primeras bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan un 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' o 3' no emparejadas/número total de bases en la secuencia de búsqueda) por lo que se resta un 10 % a la puntuación de identidad porcentual calculada por el programa CLUSTALW. Si las 90 bases restantes estuviesen perfectamente emparejadas, la identidad porcentual final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de búsqueda de 100 bases. En esta ocasión, las eliminaciones son eliminaciones internas, por lo que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia objeto que no estén emparejadas/alineadas con la secuencia de búsqueda. En este caso, la identidad porcentual calculada por el programa CLUSTALW no se corrige manualmente. Nuevamente, solo las bases en 5' y 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia de búsqueda se corrigen manualmente. No se necesitan otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Además del método anterior para alinear dos o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas para llegar a un valor de identidad porcentual para las secuencias alineadas, en algunos casos puede ser deseable usar una versión modificada del algoritmo CLUSTALW que tiene en cuenta características estructurales conocidas de las secuencias que se van a alinear, tales como, por ejemplo, las denominaciones SWISS-PROT® para cada secuencia. El resultado de dicho algoritmo de CLUSTALW modificado puede proporcionar un valor más preciso de la identidad porcentual para dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas. Se proporciona soporte para dicha versión modificada de CLUSTALW con el algoritmo CLUSTALW y se apreciará fácilmente por un experto en la técnica de bioinformática.

Las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Se prefieren especialmente variantes polinucleotídicas que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones silentes, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Se prefieren variantes nucleotídicas producidas por sustituciones silentes debidas a la degeneración del código genético. Además, también se prefieren variantes en las que se sustituyen, eliminan o añaden 5-10, 1-5 o 1-2 aminoácidos en cualquier combinación. Pueden producirse variantes polinucleotídicas por diversas razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambio de codones en el ARNm a aquellos preferidos por un hospedador bacteriano, tal como *E. coli*).

Las variantes de origen natural se denominan "variantes alélicas" y se refieren a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel de polinucleótido y/o de polipéptido. Como alternativa, pueden producirse variantes de origen no natural mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Pueden generarse variantes usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden eliminarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de la proteína sin pérdida sustancial de la función biológica. Los autores de Ron et al., J. Biol. Chem. 268:2984-2988 (1993), comunicaron proteínas de KGF

variantes que tenían actividad de unión a heparina incluso después de eliminar 3, 8, o 27 restos de aminoácidos amino-terminales. De manera similar, El interferón gamma mostró una actividad hasta diez veces mayor después de eliminar 8-10 restos de aminoácidos del extremo carboxilo de esta proteína (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988)).

Además, muchas pruebas demuestran que las variantes a menudo retienen una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. Chem. 268:22105-22111 (1993)) llevaron a cabo extensos análisis mutacionales de la citocina IL-1a. Usaron mutagénesis al azar para generar más de 3.500 mutantes individuales de IL-1a que tenían de promedio 2,5 cambios de aminoácidos por variante respecto a la longitud completa de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posición de aminoácidos posible. Los investigadores descubrieron que "la mayoría de la molécula podía alterarse con poco efecto [en la actividad de unión o biológica]". De hecho, solo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de las más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difiriese significativamente en cuanto a actividad respecto de la de tipo silvestre.

Además, incluso si eliminar uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, todavía pueden mantenerse otras actividades biológicas. Por ejemplo, probablemente se mantendrá la capacidad de una variante de eliminación para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen a la proteína cuando se eliminan menos de la mayoría de los restos de la proteína del extremo N-terminal o del extremo C-terminal. Puede determinarse fácilmente si un polipéptido particular que carece de restos N- o C-terminales de una proteína mantiene dichas actividades inmunogénicas mediante métodos rutinarios descritos en el presente documento y de otro modo conocidos en la técnica.

Como alternativa, dichas eliminaciones del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido de la presente invención pueden, de hecho, dar como resultado un aumento significativo en una o más de las actividades biológicas del polipéptido (o los polipéptidos). Por ejemplo, la actividad biológica de muchos polipéptidos está gobernada por la presencia de dominios reguladores en uno o ambos extremos. Dichos dominios reguladores inhiben de manera eficaz la actividad biológica de dichos polipéptidos en lugar de un evento de activación (por ejemplo, unión a un ligando o receptor afín, fosforilación, procesamiento proteolítico, etc.). Por lo tanto, al eliminar el dominio regulador de un polipéptido, el polipéptido puede hacerse biológicamente activo de manera eficaz en ausencia de un evento de activación.

Por lo tanto, en el presente documento se describen variantes polipeptídicas que muestran actividad biológica sustancial. Dichas variantes incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica para que tengan poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, se proporciona una orientación referente a cómo preparar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silentes en Bowie et al., Science 247:1306-1310 (1990), en el que los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia aminoacídica al cambio.

La primera estrategia explota la tolerancia de sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso de evolución. Al comparar secuencias aminoacídicas en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Es probable que estos restos de aminoácidos conservados sean importantes para la función de proteínas. Por el contrario, las posiciones de aminoácidos donde se han tolerado las sustituciones mediante selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de proteínas. Por lo tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos podrían modificarse a la vez que se mantiene la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de proteínas. Por ejemplo, pueden usarse mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis de barrido de alanina (introducción de mutaciones simples de alanina en cada resto de la molécula. (Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Por tanto puede ensayarse la actividad biológica de las moléculas resultantes.

Tal como afirman los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son elevadamente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos tienen más probabilidad de ser permisivos en determinadas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, la mayoría de restos de aminoácidos enterrados (en la estructura terciaria de la proteína) necesitan cadenas laterales no polares, mientras que generalmente se conservan pocas características de cadenas laterales superficiales.

En el presente documento se describen polipéptidos que tienen un menor grado de identidad pero que tienen suficiente similitud como para efectuar una o más de las mismas funciones efectuadas por el polipéptido de la presente invención. La similitud se determina mediante sustitución de aminoácidos conservados. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares (por ejemplo, propiedades químicas). De acuerdo con Cunningham et al. anteriormente, es probable que dichas sustituciones conservativas sean fenotípicamente silentes. Se encuentra orientación adicional referente a qué cambios de aminoácidos tienen más probabilidades de ser fenotípicamente silentes en Bowie et al., Science 247:1306-1310

(1990).

Las sustituciones de aminoácidos conservativas toleradas implican el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu e Ile; reemplazo de los restos hidroxilo Ser y Thr; reemplazo de los restos ácidos Asp y Glu; reemplazo de los restos amida Asn y Gln; reemplazo de los restos básicos Lys, Arg, e His; reemplazo de los restos aromáticos Phe, Tyr, y Trp; y reemplazo de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met, y Gly.

Se proporcionan sustituciones conservativas adicionales en la Tabla III a continuación.

TABLA III

Para el aminoácido	Código	Reemplazar con cualquiera de:
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp,
Acido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, ácido L-1-tioazolidin-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidin-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, He, D-Ile, Met, D-Met

Aparte de los usos descritos anteriormente, dichas sustituciones de aminoácidos pueden aumentar la estabilidad proteica o peptídica. Las sustituciones de aminoácidos pueden contener, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que reemplazan a los enlaces peptídicos) en la secuencia de proteína o peptídica. Las sustituciones pueden incluir restos de aminoácidos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos de origen no natural o sintéticos, por ejemplo, β o γ aminoácidos.

Tanto la identidad como la similitud pueden calcularse fácilmente haciendo referencia a las siguientes publicaciones: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Informatics Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J. eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991.

La sustitución de aminoácidos puede basarse en la probabilidad de que una sustitución de aminoácidos de como resultado la conservación de la función. Dichas probabilidades se determinan alineando múltiples genes con función relacionada y evaluando la penalización relativa de cada sustitución con la función génica adecuada. A menudo dichas probabilidades se describen en una matriz y se usan por algunos algoritmos (por ejemplo, BLAST®, CLUSTALW, GAP®, etc.) en el cálculo de la similitud porcentual en los que la similitud se refiere al grado en el que un aminoácido puede sustituir a otro aminoácido sin pérdida de función. Un ejemplo de dicha matriz es la matriz PAM250 o BLOSUM62.

Aparte de las sustituciones químicamente conservativas canónicas citadas anteriormente, pueden introducirse sustituciones que no se clasifican normalmente como conservativas, pero que pueden ser químicamente conservativas en determinadas circunstancias. El análisis de catálisis enzimática para proteasas, por ejemplo, ha demostrado que determinados aminoácidos en el sitio activo de algunas enzimas pueden tener pKa elevadamente alterados debido al microambiente único del sitio activo. Dichos pKa alterados pueden permitir que algunos aminoácidos sustituyan a otros aminoácidos a la vez que se conservan la estructura enzimática y la función. Los ejemplos de aminoácidos conocidos que tienen restos de aminoácidos con pKa alterados son el resto Glu-35 de lisozima, el resto Ile-16 de quimiotripsina, el resto His-159 de papaína, etc. La conservación de función se refiere bien a la protonación anómala o a la desprotonación anómala de dichos aminoácidos, en relación a sus pKa canónicos no alterados. La perturbación del pKa puede permitir a estos aminoácidos participar activamente en la catálisis ácido-base general debido al ambiente de ionización único en el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, la sustitución de un aminoácido capaz de servir bien como un ácido general o como una base general en el microambiente de un sitio activo o cavidad enzimática, como puede ser el caso, con la misma capacidad o similar que el aminoácido de tipo silvestre, podría servir de manera eficaz como una sustitución de aminoácido conservativa.

Aparte de la sustitución conservativa de aminoácidos, las variantes de los polipéptidos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las siguientes: (i) sustituciones con uno o más de los restos aminoacídicos no conservados, donde los restos de aminoácidos conservados pueden estar o no codificados por el código genético, o (ii) sustitución con uno o más restos de aminoácidos que tienen un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de región de fusión de Fc de IgG, o una secuencia líder o secretoria, o una secuencia que facilita la purificación. Se considera que dichos polipéptidos variantes se encuentran dentro del ámbito de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Por ejemplo, las variantes de polipéptidos que contiene sustituciones de aminoácidos de aminoácidos cargados con otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como menor agregación. La agregación de formulaciones farmacéuticas reduce la actividad y aumenta la eliminación debido a la actividad inmunogénica de los agregados. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36:838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).

Además, pueden crearse variantes de polipéptidos creadas mediante la aplicación de metodologías evolución molecular ("reordenamiento de ADN") al polinucleótido divulgado como SEC ID N°: X, a la secuencia del clon remitido en un depósito, y/o al ADNc que codifica el polipéptido divulgado como SEC ID N°: Y. Dicha tecnología de reordenamiento de ADN se conoce en la técnica y se describe más particularmente en otras partes del presente documento (por ejemplo, WPC, Stemmer, PNAS, 91:10747, (1994)), y en los Ejemplos proporcionados en el presente documento).

En el presente documento se describe un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la presente invención que tiene una secuencia aminoacídica que contiene al menos una sustitución de aminoácidos, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos, incluso más preferentemente, no más de 40 sustituciones de aminoácidos, aún más preferentemente, no más de 30 sustituciones de aminoácidos, y aún más preferentemente, no más de 20 sustituciones de aminoácidos. Por supuesto, en orden de mayor preferencia, es elevadamente preferible que un péptido o polipéptido tenga una secuencia aminoacídica que comprende la secuencia aminoacídica de la presente invención, que contiene al menos una, pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución de aminoácidos. En particular, es preferible que el número de adiciones, sustituciones, y/o eliminaciones en la secuencia aminoacídica de la presente invención o en fragmentos de la misma (por ejemplo, la forma madura y/u otros fragmentos descritos en el presente documento), pueda ser de 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 o 50-150 sustituciones conservativas de aminoácidos.

Fragmentos polinucleotídicos y polipeptídicos

En el presente documento se describen fragmentos polinucleotídicos de los polinucleótidos de la invención, además de polipéptidos codificados en la misma por dichos polinucleótidos y/o fragmentos.

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento polinucleotídico" se refiere a un polinucleótido corto que tiene una secuencia de ácido nucleico que: es una porción de la contenida en un clon depositado, o que codifica el polipéptido codificado por el ADNc en un clon depositado; es una porción de aquella mostrada en SEC ID N°: X o la hebra complementaria de la misma, o es una porción de una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de SEC ID N°: Y. Los fragmentos de nucleótidos descritos en el presente documento son preferentemente de al menos aproximadamente 15 nt, y más preferentemente de al menos aproximadamente 20 nt, aún más preferentemente de al menos aproximadamente 30 nt, e incluso más preferentemente, al menos aproximadamente 40 nt, al menos aproximadamente 50 nt, al menos aproximadamente 75 nt, o al menos aproximadamente 150 nt de longitud, o al menos aproximadamente 875 nt de longitud, o al menos aproximadamente 837 nt de longitud, o al menos aproximadamente 903 nt de longitud, o al menos aproximadamente 915 nt de longitud, o al menos aproximadamente 930 nt de longitud, o al menos aproximadamente 945 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1000 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1050 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1100 nt de longitud, o al menos

aproximadamente 1150 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1200 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1250 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1300 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1350 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1400 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1450 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1500 nt de longitud, o al menos aproximadamente 1554 nt de longitud. Un fragmento de "al menos 20 nt de longitud", por ejemplo, pretende incluir 20 o más bases contiguas a partir de la secuencia de ADNc contenida en un clon depositado o la secuencia nucleotídica mostrada en la SEC ID N^o: X. En este contexto, "aproximadamente" incluye el valor citado particularmente, un valor mayor o menor en varios nucleótidos (25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1), en cualquier extremo, o en ambos extremos. Estos fragmentos nucleotídicos tienen usos que incluyen, pero sin limitación, como sondas y cebadores diagnósticos, tal como se discute en el presente documento. Por supuesto, se prefieren fragmentos mayores (por ejemplo, 50, 150, 500, 600, 837, 903, 1554, 2000 nucleótidos).

Además, los ejemplos representativos de los fragmentos polinucleotídicos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o como alternativa consisten en, una secuencia de un número de nucleótidos de aproximadamente 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300, 1301-1350, 1351-1400, 1401-1450, 1451-1500, 1501-1550, 1551-1600, 1601-1650, 1651-1700, 1701-1750, 1751-1800, 1801-1850, 1851-1900, 1901-1950, 1951-2000, o 2001 hasta el extremo de SEC ID N^o: X, o de la hebra complementaria de la misma, o del ADNc contenido en un clon depositado. En este contexto, "aproximadamente" incluye los intervalos citados particularmente, e intervalos mayores o menores en varios nucleótidos (5, 4, 3, 2, o 1), en uno de los extremos o en ambos extremos. Preferentemente, estos fragmentos codifican un polipéptido que tiene actividad biológica. Más preferentemente, estos polinucleótidos pueden usarse como sondas o cebadores, tal como se discute en el presente documento. También se describen en el presente documento polinucleótidos que hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones rigurosas de hibridación o en condiciones de menor rigurosidad, al igual que polipéptidos codificados por estos polinucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, un "fragmento polipeptídico" se refiere a una secuencia aminoacídica que es una porción de aquella contenida en la SEC ID N^o: Y o codificada por el ADNc contenido en un clon depositado. Los fragmentos proteicos (polipéptidos) pueden ser "independientes" o estar comprendidos en un polipéptido mayor del cual el fragmento forma una parte o una región, más preferentemente como una sola región continua. Los ejemplos representativos de los fragmentos polipeptídicos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, fragmentos que comprenden, o como alternativa consisten en, desde aproximadamente el aminoácido número 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 102-120, 121-140, 141-160, o 161 hasta el final de la región codificante. Además, los fragmentos polipeptídicos pueden ser de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 279, 301, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, o 518 aminoácidos de longitud. En este contexto, "aproximadamente" incluye los intervalos o valores citados particularmente, e intervalos o valores mayores o menores en varios aminoácidos (25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1), en uno de los extremos o en ambos extremos. También se describen en el presente documento polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

Los fragmentos polipeptídicos preferidos incluyen la proteína de longitud completa. Los fragmentos polipeptídicos adicionales preferidos incluyen la proteína de longitud completa que tiene una serie continua de restos eliminados de los extremos amino o carboxilo, o ambos. Por ejemplo, puede eliminarse cualquier número de aminoácidos, en el intervalo de 1-60, del extremo amino del polipéptido de longitud completa. De manera similar, puede eliminarse cualquier número de aminoácidos, en el intervalo de 1-30, del extremo carboxilo de la proteína de longitud completa. Además, se prefiere cualquier combinación de las eliminaciones en amino y carboxilo terminal. De manera similar, también se prefieren los polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

También se prefieren fragmentos polipeptídicos y polinucleotídicos caracterizados por dominios estructurales o funcionales, tales como fragmentos que comprenden alfa-hélice y regiones formadoras de alfa-hélice, beta-lámina y regiones formadoras de beta-lámina, giros y regiones formadoras de giros, bucles y regiones formadoras de bucles, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie, regiones de unión a sustrato y regiones de elevado índice antigénico. Los fragmentos polipeptídicos de SEC ID N^o: Y que se encuentran dentro de dominios conservados se contemplan específicamente en el presente documento. Además, también se contemplan los polipéptidos que codifican estos dominios.

Otros fragmentos polipeptídicos preferidos son fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que muestran una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido de la presente invención. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad mejorada deseada, o una actividad no deseada disminuida. En el presente documento también se describen polinucleótidos que codifican estos fragmentos polipeptídicos.

Preferentemente, la actividad funcional mostrada por un polipéptido codificado por un fragmento polinucleotídico descrito en el presente documento puede ser una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el

polipéptido de longitud completa de la invención. De manera ilustrativa, estas actividades biológicas incluyen la capacidad de los fragmentos para unirse a al menos uno de los mismos anticuerpos a los que se une la proteína de longitud completa, la capacidad del fragmento para interactuar con al menos una de las mismas proteínas que se unen a la de longitud completa, la capacidad de los fragmentos para provocar al menos una de las mismas respuestas inmunes que la proteína de longitud completa (es decir, hacer que el sistema inmunitario cree anticuerpos específicos para el mismo epítipo, etc.), la capacidad de los fragmentos para unirse a al menos uno de los mismos polinucleótidos que la proteína de longitud completa, la capacidad de los fragmentos para unirse a un receptor de la proteína de longitud completa, la capacidad de los fragmentos para unirse a un ligando de la proteína de longitud completa, y la capacidad de los fragmentos para multimerizar con la proteína de longitud completa. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que algunos fragmentos pueden tener actividades biológicas que son deseables y directamente fuera de sitio de la actividad biológica de la proteína de longitud completa. La actividad funcional de los polipéptidos de la invención, incluyendo fragmentos, variantes, derivados, y análogos de los mismos pueden determinarse mediante numerosos métodos disponibles para el experto en la materia, algunos de los cuales se describen en otras partes del presente documento.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa consisten en, un epítipo del polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: Y, o en un epítipo de la secuencia polipeptídica codificada por una secuencia polinucleotídica contenida en el N° de depósito ATCC®: Z codificado por un polinucleótido que hibrida con el complemento de la secuencia de SEC ID N°: X o contenido en el N° de depósito ATCC®: Z en condiciones de hibridación rigurosas o en condiciones de hibridación de menor rigurosidad tal como se han definido anteriormente. En el presente documento se describen además secuencias polinucleotídicas que codifican un epítipo de una secuencia polipeptídica de la invención (tal como, por ejemplo, la secuencia divulgada en SEC ID N°: 1 o en SEC ID N°: 3), secuencias polinucleotídicas de la hebra complementaria de una secuencia polinucleotídica que codifica un epítipo de la invención, y secuencias polinucleotídicas que hibridan con la hebra complementaria en condiciones rigurosas de hibridación o en condiciones de hibridación de menor rigurosidad, tal como se han definido anteriormente.

El término "epítipos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a porciones de un polipéptido que tienen actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente en un ser humano. En una realización preferida, la presente invención abarca un polipéptido que comprende un epítipo, así como el polinucleótido que codifica este polipéptido. Un "epítipo inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal, tal como se determina mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante los métodos para generar anticuerpos descritos más adelante. (Véase, por ejemplo, Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983)). La expresión "epítipo antigénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de una proteína a la que puede unirse inmunoespecíficamente un anticuerpo a su antígeno, tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el inmunoensayo descrito en el presente documento. La unión inmunoespecífica excluye a la unión no específica pero no excluye necesariamente a la reactividad cruzada con otros antígenos. Los epítipos antigénicos no tienen por qué ser necesariamente inmunogénicos.

Los fragmentos que funcionan como epítipos pueden producirse mediante cualquier medio convencional. (Véase, por ejemplo, Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985), descrito adicionalmente en la patente de Estados Unidos N° 4.631.211).

Los epítipos antigénicos contienen preferentemente una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, y, lo más preferentemente, entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos. Los polipéptidos preferidos que comprenden epítipos inmunogénicos o antigénicos son de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 restos de aminoácidos de longitud, o mayores. Los epítipos antigénicos preferidos no exclusivos adicionales incluyen los epítipos antigénicos divulgados en el presente documento, así como porciones de los mismos. Los epítipos antigénicos son útiles, por ejemplo, para provocar anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente al epítipo. Los epítipos antigénicos preferidos incluyen los epítipos antigénicos divulgados en el presente documento, así como cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco o más de estos epítipos antigénicos. Los epítipos antigénicos pueden usarse como moléculas dianas en inmunoensayos. (Véase, por ejemplo, Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984); Sutcliffe et al., Science 219:660-666 (1983)).

De manera similar, pueden usarse epítipos inmunogénicos, por ejemplo, para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia. (Véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., anteriormente citado; Wilson et al., anteriormente citado; Chow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; y Bittle et al., J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985)). Los epítipos inmunogénicos preferidos incluyen los epítipos inmunogénicos divulgados en el presente documento, así como cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco o más de estos epítipos inmunogénicos. Los polipéptidos que comprenden uno o más epítipos inmunogénicos pueden presentarse para provocar una respuesta de anticuerpos junto con una proteína transportadora, tal como una albúmina, a un sistema animal (tal como un conejo o ratón), o, si el polipéptido es de la longitud suficiente (al menos aproximadamente 25 aminoácidos), el polipéptido

puede presentarse sin un transportador. Sin embargo, los epítomos inmunogénicos que comprenden tan pocos como 8 a 10 aminoácidos han demostrado ser suficientes para provocar anticuerpos capaces de unirse a, por lo menos, epítomos lineales en un polipéptido desnaturalizado (por ejemplo, en una transferencia de Western).

Los polipéptidos portadores de epítomos de la presente invención pueden usarse para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro*, y métodos de presentación en fagos. Véase, por ejemplo, Sutcliffe et al., anteriormente citado; Wilson et al., anteriormente citado, y Bittle et al., J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985). Si se usa inmunización *in vivo*, puede inmunizarse a los animales con péptido libre; sin embargo, puede reforzarse el título de anticuerpo anti-péptido acoplando el péptido a un transportador macromolecular, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o toxoide tetánico. Por ejemplo, los péptidos que contienen restos de cisteína pueden acoplarse a un vehículo usando un enlazador, tal como éster de maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a vehículos que usan un agente enlazante más general, tal como glutaraldehído. Los animales, tales como conejos, ratas y ratones se inmunizan con péptidos bien libres o bien acoplados a un vehículo, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 mg de péptido o proteína transportadora y adyuvante de Freund o cualquier otro adyuvante conocido por estimular una respuesta inmune. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar un título útil de anticuerpo anti-péptido que pueda detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo ELISA usando péptido libre adsorbido a una superficie sólida. El título de anticuerpos anti-péptido en suero de un animal inmunizado puede aumentarse mediante selección de anticuerpos anti-péptido, por ejemplo, mediante adsorción al péptido sobre un soporte sólido y eluyendo los anticuerpos seleccionados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Como apreciará un experto en la materia, y tal como se discute anteriormente, los polipéptidos de la presente invención que comprenden un epítomo inmunogénico o antigénico pueden fusionarse a otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse al dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o a porciones de los mismos (CH1, CH2, CH3, o cualquier combinación de los mismos y porciones de los mismos) dando como resultado polipéptidos quiméricos. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y pueden aumentar la semivida *in vivo*. Esto se ha demostrado para proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulinas de mamífero. Véase, por ejemplo, el documento EP 394.827; Trauneker et al., Nature, 331:84-86 (1988). Se ha demostrado la administración potenciada de un antígeno a través de la barrera epitelial al sistema inmune para antígenos (por ejemplo, insulina) conjugados a un compañero de unión a FcRn, tal como una IgG o fragmentos Fc (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 96/22024 y WO 99/04813). Se ha descubierto que las proteínas de fusión a IgG que tienen una estructura dimérica enlazada con disulfuro debido a los enlaces disulfuro de la porción de IgG son más eficaces uniéndose y neutralizando otras moléculas que solo polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos. Véase, por ejemplo, Fountoulakis et al., J. Biochem., 270:3958-3964 (1995). También pueden recombinarse los ácidos nucleicos que codifican los epítomos anteriores con un gen de interés, tal como un marcador epitópico (por ejemplo, el marcador de hemaglutinina ("HA") o el marcador flag) para ayudar en la detección y purificación del polipéptido expresado. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al. permite purificar fácilmente proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido recombinante de *vaccinia* de tal forma que el marco de lectura abierto del gen se fusiona traduccionalmente con un marcador amino-terminal que consiste en seis restos de histidina. El marcador sirve como dominio de unión a matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus *vaccinia* recombinante se cargan en columnas de Ni²⁺, ácido nitriloacético-agarosa y las proteínas marcadas con histidina pueden eluirse selectivamente con tampones que contienen imidazol.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de reordenamiento génico, de reordenamiento de motivos, de reordenamiento de exones, y/o de reordenamiento de codones (citados colectivamente como "reordenamiento de ADN"). El reordenamiento de ADN puede emplearse para modular las actividades de polipéptidos de la invención, dichos métodos pueden usarse para generar polipéptidos con actividad alterada, así como agonistas y antagonistas de los polipéptidos. Véase, en general, las Patentes de los Estados Unidos con números 5.605.793, 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997). Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson, et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999), y Lorenzo y Blasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998). La alteración de polinucleótidos correspondientes a SEC ID N°: X y los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos puede lograrse mediante reordenamiento de ADN. El reordenamiento de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN mediante recombinación de homólogos o de sitio específico para generar variación en la secuencia polinucleotídica. Los polinucleótidos de la invención, o los polipéptidos codificados, pueden alterarse sometiendo a mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores, inserción al azar de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención pueden combinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Anticuerpos

En el presente documento se describen anticuerpos y receptores de antígenos de linfocitos T (TCR) adicionales que se unen inmuno-específicamente a un polipéptido, fragmento polipeptídico, o variante de SEC ID N°: 2, y/o un epítipo de la presente invención (determinado mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para ensayar la unión específica antígeno-anticuerpo). Los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, biespecíficos, heteroconjugados, multiespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina. Además, el término "anticuerpo" (Ac) o "anticuerpo monoclonal" (AcM) pretende incluir moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal o planta, y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., J. Nucl. Med., 24:316-325 (1983)). Por lo tanto, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios, y humanizados.

Más preferentemente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender solo la región o regiones variables o en combinación con la totalidad o una porción de las siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a antígeno que también comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra y dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humanos, murinos (por ejemplo, ratón y rata), de burro, de oveja, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo. Tal como se usa en el presente documento, los anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe más adelante y por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 5.939.598 de Kucherlapati et al.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de la presente invención como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802 WO 91/00360 WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991), las Patentes de los Estados Unidos con números 4.474.893, 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en cuanto a los epítopos o porciones de un polipéptido de la presente invención al cual reconocen o se unen específicamente. Los epítopos o porciones polipeptídicas pueden especificarse tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante posiciones N-terminales y C-terminales, mediante tamaño en restos de aminoácidos contiguos, o listarse en las Tablas y Figuras. Los anticuerpos que se unen específicamente a cualquier epítipo o polipéptido de la presente invención también pueden excluirse. Por lo tanto, la presente invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de la presente invención, y permite la exclusión de los mismos.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en cuanto a su reactividad cruzada. Los anticuerpos que no se unen a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido de la presente invención están incluidos. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos con al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, y al menos un 50 % de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) a un polipéptido de la presente invención también se incluyen en la presente invención. En realizaciones específicas, los anticuerpos de la presente invención reaccionan de manera cruzada con homólogos murinos, de rata y/o conejo de proteínas humanas y con los epítopos correspondientes de los mismos. Los anticuerpos que no se unen a polipéptidos con menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 %, y menos del 50 % de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) a un polipéptido de la presente invención también se incluyen en la presente invención. En una realización específica, la reactividad cruzada anteriormente descrita es con respecto a cualquier polipéptido antigénico o inmunogénico individual, o combinaciones

- de 2, 3, 4, 5, o más de los polipéptidos antigénicos y/o inmunogénicos divulgados en el presente documento. En la presente invención se incluyen además anticuerpos que se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido de la presente invención en condiciones rigurosas de hibridación (tal como se describen en el presente documento). Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en cuanto a su afinidad de unión a un polipéptido de la invención. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d de menos de 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.
- La invención también proporciona anticuerpos que inhiben de manera competitiva la unión de un anticuerpo a un epítipo de la invención según se determina mediante cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, el inmunoensayo descrito en el presente documento. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión del epítipo en al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 %.
- Los anticuerpos de la presente invención pueden actuar como agonistas o antagonistas de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos que interrumpen las interacciones receptor/ligando con los polipéptidos de la invención bien parcialmente o bien completamente. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención se unen a un epítipo antigénico divulgado en el presente documento, o a una porción del mismo. La invención presenta tanto anticuerpos específicos de receptor como anticuerpos específicos de ligando. La invención también presenta anticuerpos específicos de receptor que no evitan la unión a ligando pero que evitan la activación del receptor. La activación del receptor (es decir, señalización) puede determinarse mediante técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. Por ejemplo, la activación de receptor puede determinarse detectando la fosforilación (por ejemplo, de tirosina o de serina/treonina) del receptor o su sustrato mediante inmunoprecipitación seguida de análisis de transferencia de Western (por ejemplo, tal como se describe anteriormente). En realizaciones específicas, se proporcionan anticuerpos que inhiben la actividad de ligando o la actividad de receptor en al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 % de la actividad en ausencia del anticuerpo.
- La invención también presenta anticuerpos específicos de receptor que evitan tanto la unión del ligando como la activación del receptor así como anticuerpos que reconocen al complejo ligando-receptor, y, preferentemente, no reconocen específicamente al receptor no unido o al ligando no unido. Del mismo modo, se incluyen en la invención anticuerpos neutralizantes que se unen al ligando y evitan la unión del ligando al receptor, así como anticuerpos que se unen al ligando, evitando de este modo la activación del receptor, pero que no evitan que el ligando se una al receptor. Se incluyen además en la invención anticuerpos que activan al receptor. Estos anticuerpos pueden actuar como agonistas del receptor, es decir, potencian o activan todas o un subconjunto de las actividades biológicas de la activación del receptor mediada por ligando, por ejemplo, induciendo la dimerización del receptor. Los anticuerpos pueden especificarse como agonistas, antagonistas o agonistas inversos para las actividades biológicas que comprenden las actividades biológicas específicas de los péptidos de la invención divulgados en el presente documento. Los agonistas de anticuerpos anteriores pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 96/40281; la patente de Estados Unidos N° 5.811.097; Deng et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4):755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20 (1996).
- Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, pero sin limitación, para purificar, detectar, y dirigirse a los polipéptidos de la presente invención, incluyendo métodos diagnósticos y terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos son útiles en inmunoensayos para medir cualitativamente y cuantitativamente los niveles de los polipéptidos de la presente invención en muestras biológicas. Véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).
- Tal como se discute en más detalle a continuación, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse bien solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además fusionarse a un polipéptido heterólogo en el extremo N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse recombinantemente a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y como moléculas efectoras, tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de Estados Unidos N° 5.314.995; y el documento EP 396.387.
- Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de tal forma que la unión covalente no evita que el anticuerpo genere una respuesta antiidiotípica. Por ejemplo, pero no como limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que

se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Puede llevarse a cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia (Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); y *Current Protocols*, Capítulo 2). En un método preferido, se prepara una preparación de la proteína PCSK9b o PCSK9c y se purifica para dejarla sustancialmente libre de contaminantes naturales. Dicha preparación se introduce entonces en un animal para producir antisueros policlonales de mayor actividad específica. Por ejemplo, puede administrarse un polipéptido de la invención a varios animales hospedadores incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. La administración de los polipéptidos de la presente invención puede conllevar una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también se conocen bien en la técnica. Para los fines de la invención, un "agente inmunizante" puede definirse como un polipéptido de la invención, incluyendo fragmentos, variantes, y/o derivados de los mismos, además de fusiones con los polipéptidos heterólogos y otras formas de los polipéptidos descritos en el presente documento.

Normalmente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectará al mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales, aunque también pueden administrarse intramuscularmente, y/o por vía IV. El agente inmunizante puede incluir polipéptidos de la presente invención o una proteína de fusión o variantes de las mismas. Dependiendo de la naturaleza de los polipéptidos (es decir, hidrofobicidad porcentual, hidrofiliadad porcentual, estabilidad, carga neta, punto isoeléctrico, etc.), puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Dicha conjugación incluye bien conjugación derivatizando grupos funcionales químicos activos tanto al polipéptido de la presente invención y la proteína inmunogénica, de tal modo que se forma un enlace covalente, o mediante metodología basada en proteínas de fusión, u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo, pero sin limitación adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales, tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como lisolecitina, polioles plurónicas, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante MPL-TDM (lípidos A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin experimentación innecesaria.

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) y la Patente de los Estados Unidos Nº 4.376.110, por Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988), por Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., págs. 563-681 (1981); Köhler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976); Köhler et al., *Eur. J. Immunol.* 6:292 (1976), u otros métodos conocidos por el experto en la materia. Otros ejemplos de métodos que pueden emplearse para producir anticuerpos monoclonales incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma de linfocitos B (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), y la técnica de hibridoma de VEB (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. El hibridoma que produce el AcM de esta invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos elevados de AcM *in vivo* convierte a éste en el método de producción preferido.

En un método de hibridoma, se inmuniza normalmente a un ratón, un ratón humanizado, un ratón con un sistema inmunitario humano u otro animal hospedador adecuado con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá normalmente polipéptidos de la presente invención o una proteína de fusión de los mismos. Preferentemente, el agente inmunizante consiste en un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c o, más

preferentemente, en una célula que expresa polipéptido de PCSK9b o PCSK9c. Dichas células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo tisular adecuado; sin embargo, es preferible cultivar las células en medio Eagle modificado de Earle suplementado con suero bovino fetal al 10 % (inactivado a aproximadamente 56 °C), y suplementarse con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1.000 U/ml de penicilina, y aproximadamente 100 µg/ml de estreptomycin. En general, se usan bien linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Entonces se fusionan los linfocitos con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Generalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no fusionadas inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), evitando estas sustancias el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionen eficazmente, que soporten niveles de expresión elevados de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y que sean sensibles a un medio, tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son líneas de mieloma murino que pueden obtenerse, por ejemplo, a través del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. La más preferida es la línea celular parental de mieloma (SP20) proporcionada por la ATCC®. Tal como se infiere a lo largo de la memoria descriptiva, también se han descrito líneas de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse en busca de la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas se conocen en la técnica y por los expertos en la materia. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollart, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecerse mediante métodos convencionales (Goding, anteriormente citado, y/o de acuerdo con Wands et al., *Gastroenterology* 80:225-232 (1981)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado de Dulbecco y RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

El experto en la materia reconocerá que existe diversos métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y, por lo tanto, la invención no se limita solo a su producción en hibridomas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567. En este contexto, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un solo clon eucariota, fago, o procariota. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos, o de dichas cadenas de fuentes humanas, humanizadas u otras). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transforman en células hospedadoras, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. También puede modificarse el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison et al., anteriormente citado) o uniendo covalentemente la secuencia codificante de inmunoglobulina a la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier posición en la región

Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Como alternativa, se sustituyen los restos de cisteína relevantes con otro resto de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

También son adecuados los métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos Fab, puede llevarse a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una gran variedad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes, y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma, incluyendo aquellas conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica y se discuten en detalle en los Ejemplos descritos en el presente documento. En un ejemplo no limitante, puede inmunizarse a los ratones con un polipéptido de la invención o con una célula que expresa dicho péptido. Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se recoge el bazo de ratón y se aíslan los esplenocitos. Después se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible a través de la ATCC®. Los hibridomas se seleccionan y clonan mediante dilución limitante. Después se ensayan los clones de hibridoma mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. El fluido de ascitis, que generalmente contiene elevados niveles de anticuerpos, puede generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos mediante el método que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención, en el que, preferentemente, se genera el hibridoma fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y después seleccionar los hibridomas resultantes de la fusión de clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse al polipéptido de la invención.

Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas, tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpo funcionales se muestran sobre la superficie de partículas de fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, dicho fago puede usarse para mostrar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una perla. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados recombinantemente a la proteína de gen III o de gen VIII de fago. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen aquellos divulgados en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994). Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); la solicitud PCT N°: PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Tal como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, pueden aislarse las regiones codificantes de anticuerpo del fago y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras, y bacterias, por ejemplo, tal como se describe detalladamente más adelante. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos divulgados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988). Los ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv y

anticuerpos monocatenarios incluyen aquellas descritas en las Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

5 Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y en ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Cabilly et al., Taniguchi et al., documento EP 171496; Morrison et al., documento EP 173494; Neuberger et al., documento WO 8601533; Robinson et al., documento WO 8702671; Boulianne et al., *Nature* 312:643 (1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268 (1985); Patentes de los Estados Unidos con números 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos estructurales en las regiones marco conservadas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de la CDR y restos estructurales para identificar restos estructurales importantes para la unión a antígeno y comparación de secuencia para identificar restos estructurales frecuentes en posiciones concretas. (Véase, por ejemplo, Queen et al., la patente de Estados Unidos Nº 5.585.089; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)). Los anticuerpos pueden humanizarse usando diversas técnicas conocidas en la materia incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos con números 5.225.539, 5.530.101; y 5.585.089), chapado o recubrimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)), y reordenamiento de cadena (Patente de los Estados Unidos Nº 5.565.332). En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986). Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988). Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988), mediante la sustitución de CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos a partir de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquellas de una inmunoglobulina humana (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986). Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)1 y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos para el tratamiento de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse por diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos con números 4.444.887 y 4.716.111, y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. Las técnicas de Cole et al., y Boerder et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss, (1985); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95, (1991)).

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, pueden introducirse los complejos génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana al azar o mediante recombinación de homólogos en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera humanos. Los genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina de ratón pueden hacerse no funcionales por separado o simultáneamente mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana mediante recombinación de homólogos. En particular, la eliminación homocigótica de las regiones JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Después se crían los ratones quiméricos para que produzcan descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera

normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o parte de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana portados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos terapéuticamente útiles de IgG, IgA, IgM e IgE. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la Patente Europea N^o: 0 598 877; las Patentes de los Estados Unidos con números 5.413.923, 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598. Además, puede contratarse a compañías tales como Genpharm (San Jose, CA) y Medarex, Inc. (Princeton, NJ) para que proporcionen anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la descrita anteriormente.

De manera similar, pueden producirse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humanos en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpo humano, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos a todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, ensamblaje, y la creación de un repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N^o 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.106, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14:845-51 (1996). Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen a un epítipo seleccionado usando una técnica citada como "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca al mismo epítipo. (Jespersen et al., *Bio/Technology* 12:899-903 (1988)).

Además, los anticuerpos para los polipéptidos de la invención pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" a polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. (Véase, por ejemplo, Greenspan y Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) y Nissinoff, *J. Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991)). Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que se unen a e inhiben competitivamente la multimerización y/o la unión de un polipéptido de la invención a un ligando para generar anti-idiotipos que "imitan" al dominio de multimerización y/o de unión del polipéptido y, por consiguiente, se unen a y neutralizan el polipéptido y/o su ligando. Dichos anti-idiotipos o fragmentos Fab neutralizantes de dichos anti-idiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar ligandos polipeptídicos. Por ejemplo, dichos anticuerpos anti-idiotipo pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención y/o para unirse a sus ligandos/receptores, y de este modo bloquear su actividad biológica.

Pueden producirse dichos anticuerpos anti-idiotípicos capaces de unirse al polipéptido de PCSK9b o PCSK9c en un procedimiento en dos etapas. Dicho método hace uso del hecho de que los anticuerpos son antígenos por sí mismo, y por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, se usan anticuerpos específicos de proteína para inmunizar a un animal, preferentemente a un ratón. Los esplenocitos de dicho animal se usan entonces para producir células de hibridoma, y se exploran las células de hibridoma para identificar clones que producen un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de proteína pueda bloquearse por el polipéptido. Dichos anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos para el anticuerpo específico de proteína y pueden usarse para inmunizar a un animal para inducir la formación de anticuerpos específicos de proteína adicionales.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente anticuerpos humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En la presente invención, una de las especificidades de unión puede dirigirse hacia un polipéptido de la presente invención, y la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína, receptor, subunidad de receptor de la superficie celular, un antígeno específico de tejido, una proteína derivada de virus, una proteína de envuelta codificada por un virus, una proteína derivada de bacterias, o una proteína de superficie bacteriana, etc.

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trautnecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transforman de manera conjunta en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Meth. In Enzym., 121:210 (1986).

También se contemplan en la presente invención anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/20373, y EP03089). Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéster. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotioato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos divulgados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

Polinucleótidos que codifican anticuerpos

La invención proporciona además polinucleótidos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo de la invención y fragmentos de los mismos. La invención también abarca polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de menor rigurosidad, por ejemplo, tal como se define anteriormente, a polinucleótidos que codifican un anticuerpo, preferentemente, que se unen específicamente a un polipéptido de la invención, preferentemente, preferentemente a un anticuerpo que se une a un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

Pueden obtenerse los polinucleótidos y determinarse la secuencia nucleotídica de los polinucleótidos mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia nucleotídica del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifica al anticuerpo a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, tal como se describe en Kutmeier et al., BioTechniques 17:242 (1994)), que, en resumen, implican la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica al anticuerpo, la hibridación y el ligamiento de aquellos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante la PCR.

Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica a un anticuerpo a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no hay disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede sintetizarse químicamente u obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o un ácido nucleico, preferentemente poli A + ARN aislado de, cualquier tejido o células que expresan al anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) mediante amplificación PCR usando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular que se va a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc a partir de una biblioteca de ADNc que codifica al anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante la PCR pueden clonarse entonces en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

Una vez que se ha determinado la secuencia nucleotídica y la correspondiente secuencia aminoacídica, puede manipularse la secuencia nucleotídica del anticuerpo usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias nucleotídicas, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis de sitio dirigido, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al., eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia aminoacídica diferente, por ejemplo, para crear sustituciones, eliminaciones, y/o inserciones de aminoácidos.

Puede inspeccionarse la secuencia aminoacídica de los dominios variables de la cadena ligera y/o pesada para identificar las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mediante métodos que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, mediante comparación con secuencias aminoacídicas conocidas de otras regiones variables de cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Pueden insertarse una o más de las CDR en las regiones marco conservadas usando técnicas de ADN recombinante rutinarias, por ejemplo, en regiones marco conservadas humanas para humanizar un anticuerpo no humano, tal como se describe anteriormente. Las regiones marco conservadas pueden ser regiones marco conservadas de origen natural o consenso, y preferentemente regiones marco conservadas humanas (véase, por ejemplo, Chothia et al., J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998) para un listado de regiones marco conservadas humanas). Preferentemente, el

polinucleótido generado mediante la combinación de las regiones marco conservadas y las CDR codifica un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la invención. Preferentemente, tal como se discute anteriormente, pueden efectuarse una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas, y, preferentemente, las sustituciones de aminoácidos mejoran la unión del anticuerpo a su antígeno. Adicionalmente, dichos métodos

5 pueden usarse para producir sustituciones o eliminaciones de aminoácidos de uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracadena para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracadena. Otras alteraciones en el polinucleótido están abarcadas por la presente invención y se encuentran dentro de las capacidades de la técnica.

10 Además, pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984). Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985)) cortando y empalmado genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón con la especificidad de antígeno adecuada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana con la actividad biológica adecuada. Tal como se describe anteriormente, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las diferentes

15 porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un AcM murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Como alternativa, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., Nature 334:544-54 (1989)) para producir anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios se forman enlazando fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un

20 puente aminoácido, dando como resultado un polipéptido monocatenario. También pueden usarse técnicas para el montaje de fragmentos de Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., Science 242:10381041 (1988)).

25 Más preferentemente, puede obtenerse un clon que codifica un anticuerpo de la presente invención de acuerdo con el método descrito en la sección de Ejemplos en el presente documento.

Métodos para producir anticuerpos

30 Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o un fragmento, derivado o análogo del mismo (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención o un anticuerpo monocatenario de la invención), requiere de la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica al anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción de las mismas (preferentemente que contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, puede producirse el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante

40 tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la materia. Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpo y señales de control transcripcional y traduccional adecuadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. La invención, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de Estados

50 Unidos Nº 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por lo tanto,

55 la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un anticuerpo monocatenario de la invención, unido operativamente a un promotor heterólogo. Preferentemente, en la expresión de anticuerpos de cadena doble, pueden expresarse conjuntamente vectores que codifican tanto las cadenas tanto pesadas como ligeras en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla a continuación.

60 Pueden utilizarse diversos sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de hospedador de expresión representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y posteriormente purificarse las secuencias de interés, pero también representan células que pueden, al transformarse o transfectarse con las secuencias codificantes nucleotídicas adecuadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o

ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión en levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que portan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotienina) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia). Preferentemente, se usan células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinantes completas, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento promotor génico temprano intermedio de citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de elevados niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, al vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante lac Z, de tal forma que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985). Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de matriz de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de trombina o de proteasa de factor Xa de tal forma que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto de GST.

En un sistema de insecto, se usa virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células hospedadoras de mamíferos, pueden utilizarse una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos donde se usa adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse entonces en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). También pueden ser necesarias señales específicas de iniciación para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación tiene que estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de la inserción completa. Estas señales de control traduccional exógenas y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa el producto génico del modo específico deseado. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamientos (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento postraduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas de hospedadores adecuados para asegurar la correcta modificación y el procesamiento de la proteína exógena expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que procesan la maquinaria celular para el procesamiento del transcrito primario, la glucosilación, y la fosforilación adecuada del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y en particular líneas celulares de cáncer de mama, tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y líneas celulares de glándula mamaria normal, tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo y alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, pueden transformarse las células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión adecuados (por ejemplo, secuencias

promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN exógeno, se pueden dejar crecer las células modificadas durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después cambiarse a un medio de selección. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren el plásmido de manera estable en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en la exploración y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Puede usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, los genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) en células tk-, hgp^{rt}- o apr^t-, respectivamente. Asimismo, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993). Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993). Mayo de 1993, TIBTECH 11(5):155-215; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Pueden aplicarse de manera rutinaria métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Ya que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

La célula hospedadora puede transfectarse conjuntamente con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo codificando un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten la expresión idéntica de polipéptidos de cadena pesada y cadena ligera. Como alternativa, puede usarse un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes de la cadena pesada para evitar un exceso tóxico de cadena pesada libre (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que una molécula de anticuerpo se ha producido por un animal, sintetizado químicamente o expresado recombinantemente, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad del antígeno por la proteína A, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o los fragmentos de los mismos pueden fusionarse a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o de otro modo conocidas en la técnica, para facilitar la purificación.

La presente invención abarca anticuerpos fusionados recombinantemente o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a un polipéptido (o porción del mismo, preferentemente a al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención para generar proteínas de fusión. La fusión no tiene por qué ser necesariamente directa, sino que puede suceder mediante secuencias enlazadoras. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de polipéptidos (o porción de los mismos, preferentemente a al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 aminoácidos del polipéptido) de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos para dirigir los polipéptidos de la presente invención a tipos celulares particulares, bien *in vitro* o *in vivo*, fusionando o conjugando los polipéptidos de la presente invención a anticuerpos específicos para receptores de la superficie celular particulares. También pueden usarse anticuerpos fusionados o conjugados a los polipéptidos de la presente invención en inmunoensayos y métodos de purificación *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harbor et al., anteriormente citado, y la publicación PCT WO 93/21232; el documento EP 439.095; Naramura et al., Immunol. Lett. 39:91-99 (1994). Patente de Estados Unidos 5.474.981; Gillies et al., PNAS 89:1428-1432 (1992); Fell et al., J. Immunol. 146:2446-2452(1991).

La presente invención incluye además composiciones que comprenden los polipéptidos de la presente invención fusionados o conjugados a dominios de anticuerpo distintos de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse a una región Fc de anticuerpo, o a una porción de la misma. La porción de anticuerpo fusionada a un polipéptido de la presente invención puede comprender la región constante, la región bisagra, el dominio CH1, el dominio CH2, y el dominio CH3 o cualquier combinación de dominios completos o porciones de los mismos. También pueden fusionarse los polipéptidos a las porciones de anticuerpos anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las porciones Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros mediante formación de enlaces disulfuro entre las porciones Fc. Pueden producirse formas multiméricas mayores fusionando los polipéptidos a porciones de IgA e IgM. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o

5 conjugarse los polipéptidos de la presente invención a porciones de anticuerpos. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos con números 5.336.603, 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851; 5.112.946; el documento EP 307.434; el documento EP 367.166; las publicaciones PCT WO 96/04388; WO 91/06570, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-5600 (1995), y Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341(1992).

Tal como se ha discutido anteriormente, los polipéptidos que corresponden a un polipéptido, fragmento polipeptídico, o variante de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 pueden fusionarse o conjugarse a las porciones de anticuerpos anteriores para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Además, los polipéptidos que corresponden a SEC ID N°: 2 o a SEC ID N°: 4 pueden fusionarse o

20 conjugarse a las porciones de anticuerpo anteriores para facilitar la purificación. Otro ejemplo comunicado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulinas de mamífero. (Documento EP 394.827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). Los polipéptidos de la presente invención fusionados o conjugados a un anticuerpo que tiene estructuras diméricas unidas mediante disulfuro (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, que la proteína monomérica secretada o que solo el

25 fragmento de proteína. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)). En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es beneficiosa para terapia y diagnóstico, y por lo tanto puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas. (Documento EP A 232,262). Como alternativa, puede desearse eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión se haya expresado, detectado y purificado. Por ejemplo, la porción Fc puede impedir la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se usa como antígeno para inmunizaciones. En el desarrollo de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado a porciones Fc con el propósito de desarrollar ensayos de exploración de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. (Véase, Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995)).

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención pueden fusionarse a secuencias

35 marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y el marcador "flag".

La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados a un agente diagnóstico o

45 terapéutico. Los anticuerpos pueden usarse diagnósticamente para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de un tumor como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse bien directamente o bien indirectamente al anticuerpo (o porción del mismo), mediante un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazante conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para su uso como agentes diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas

50 adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficeotritina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuatorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión de metal radioactivo, por ejemplo, emisores alfa, tales como, por ejemplo, ^{213}Bi . Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona,

65

mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Los conjugados de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o resto de fármaco no debe entenderse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina diftérica; una proteína, tal como factor de necrosis tumoral, interferón- α , interferón- β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF α , TNF- β , AIM I (Véase, la Publicación Internacional N° WO 97/33899), AIM II (Véase, la Publicación Internacional N° WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., Int. Immunol., 6:1567-1574 (1994)), VEGF (véase, la Publicación Internacional N° WO 99/23105), un agente trombotico o un agente anti-trombotico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de las colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Se conocen bien las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a anticuerpos, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58(1982).

Como alternativa, puede conjugarse un anticuerpo a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal como describe Segal en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

Un anticuerpo, con o sin un resto terapéutico conjugado a este, administrado solo o en combinación con factores citotóxicos y/o citocinas, puede usarse como agente terapéutico.

La presente invención también abarca la creación de anticuerpos sintéticos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención. Un ejemplo de anticuerpos sintéticos se describe en Radrizzani, M., et al., Medicina, (Aires), 59(6):753-8, (1999). Recientemente, se ha descrito una nueva clase de anticuerpos sintéticos y se citan como polímeros impresos molecularmente (MIP) (Semorex, Inc.). Los anticuerpos, péptidos, y enzimas se usan a menudo como elementos de reconocimiento molecular en sensores químicos y biológicos. Sin embargo, su carencia de estabilidad y de mecanismos de transducción de la señal limita su uso como dispositivos de detección. Los polímeros impresos molecularmente (MIP) son capaces de imitar la función de receptores biológicos pero con menos restricciones de estabilidad. Dichos polímeros proporcionan elevada sensibilidad y selectividad a la vez que se mantienen una excelente estabilidad térmica y mecánica. Los MIP tienen la capacidad de unirse a moléculas pequeñas y de dirigirse a moléculas, tales como orgánicas y proteínas con igual o mayor potencia que la de los anticuerpos naturales. Estos "súper" MIP tienen afinidades mayores por su diana y por lo tanto requieren menores concentraciones para una unión eficaz.

Durante la síntesis, los MIP se imprimen para que tengan un tamaño, forma, carga y grupos funcionales complementarios de la diana seleccionada usando la molécula diana en sí (tal como un polipéptido, anticuerpo, etc.), o una sustancia que tenga una estructura muy similar, como su "impresión" o "molde". Los MIP pueden derivatizarse con los mismos reactivos proporcionados para anticuerpos. Por ejemplo, los "súper" MIP fluorescentes pueden recubrirse sobre perlas o pocillos para su uso en separaciones o ensayos elevadamente sensibles, o para su uso en exploración de proteínas de alto rendimiento.

Además, los MIP basados en la estructura de polipéptidos de la presente invención pueden ser útiles en la exploración de compuestos que se unen a los polipéptidos de la invención. Dicho MIP haría el papel de un "receptor" sintético imitando la arquitectura nativa del polipéptido. De hecho, la capacidad de un MIP para hacer el papel de un receptor sintético ya se ha demostrado para el receptor de estrógeno (Ye, L., Yu, Y., Mosbach, K, Analyst., 126(6):760-5, (2001); Dickert, F, L., Hayden, O., Halikias, K, P, Analyst., 126(6):766-71, (2001)). Un receptor sintético puede bien

imitarse por completo (por ejemplo, en forma de proteína completa), o imitarse como una serie de péptidos cortos que corresponden a la proteína (Rachkov, A., Minoura, N, Biochim, Biophys, Acta., 1544(1-2):255-66, (2001)). Dicho MIP de receptor sintético puede emplearse en uno cualquiera o más de los métodos de exploración descritos en otras partes del presente documento.

También se ha demostrado que los MIP son útiles para "detectar" la presencia de su molécula imitada (Cheng, Z., Wang, E., Yang, X, Biosens, Bioelectron., 16(3):179-85, (2001); Jenkins, A, L., Yin, R., Jensen, J. L, Analyst., 126(6):798-802, (2001); Jenkins, A, L., Yin, R., Jensen, J. L, Analyst., 126(6):798-802, (2001)). Por ejemplo, un MIP diseñado usando un polipéptido de la presente invención puede usarse en ensayos diseñados para identificar, y potencialmente cuantificar, los niveles de dicho polipéptido en una muestra. Dicho MIP puede usarse como sustituto para cualquier componente descrito en los ensayos, o kits, proporcionados en el presente documento (por ejemplo, ELISA, etc.).

Puede emplearse una serie de métodos para crear MIP para un receptor, ligando, polipéptido, péptido o molécula orgánica específica. Se describen varios métodos preferidos por Esteban et al. en J. Anal, Chem., 370(7):795-802, (2001). Se conocen en la técnica métodos adicionales, tales como, por ejemplo, a través de Hart, B, R., Shea, K, J. J. Am. Chem. Soc., 123(9):2072-3, (2001); y Quaglia, M., Chenon, K., Hall, A, J., De, Lorenzi, E., Sellergren, B, J. Am. Chem. Soc., 123(10):2146-54, (2001).

Usos para anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de la invención

Los anticuerpos de la presente invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, dichos anticuerpos pueden usarse en ensayos diagnósticos para detectar la presencia o cuantificación de los polipéptidos de la invención en una muestra. Dicho ensayo diagnóstico puede estar compuesto de al menos dos etapas. La primera, someter a la muestra con el anticuerpo, en la que la muestra es un tejido (por ejemplo, humano, animal, etc.), fluido biológico (por ejemplo, sangre, orina, esputo, semen, fluido amniótico, saliva, etc.), extracto biológico (por ejemplo, tejido u homogenizado celular, etc.), una microplaca de proteína (por ejemplo, véase Arenkov P, et al., Anal Biochem., 278(2):123-131 (2000)), o una columna de cromatografía, etc. y una segunda etapa que implica la cuantificación de anticuerpo unido al sustrato. Como alternativa, el método puede implicar además una primera etapa de unir el anticuerpo, ya sea covalentemente, electrostáticamente o reversiblemente a un soporte sólido, y una segunda etapa de exponer al anticuerpo unido a la muestra, tal como se define anteriormente y en otras partes del presente documento.

Se conocen en la técnica diversas técnicas de ensayo diagnóstico, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos en sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo en fases bien homogéneas o heterogéneas (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., (1987), págs. 147-158). Los anticuerpos usados en los ensayos diagnósticos pueden estar marcados con un resto detectable. El resto detectable debe ser capaz de producir, de forma directa o indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^2H , ^{14}C , ^{32}P , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, proteína fluorescente verde o peroxidasa de rábano picante. Puede emplearse cualquier método conocido en la materia para conjugar el anticuerpo al resto detectable, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); Dafvid et al., Biochem., 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Metho., 40:219(1981); y Nygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407 (1982).

Los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención son útiles para la purificación por afinidad de dichos polipéptidos a partir de cultivo de células recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra un polipéptido particular se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como una resina SEPHADEX® o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. Después se pone en contacto al anticuerpo inmovilizado con una muestra que contiene a los polipéptidos que se van a purificar, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que retire sustancialmente todo el material de la muestra a excepción de los polipéptidos deseados, que se encuentran unidos al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado que liberará al polipéptido deseado del anticuerpo.

Inmunofenotipado

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inmunofenotipar líneas celulares y muestras biológicas. El producto de traducción del gen de la presente invención puede ser útil como marcador específico de células, o más específicamente, como un marcador celular que se expresa diferencialmente en varios estados de diferenciación y/o maduración de tipos celulares particulares. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo específico, o una combinación de epítopos, permitirán la exploración de poblaciones celulares que expresan el marcador. Pueden utilizarse varias técnicas que usan anticuerpos monoclonales para explorar poblaciones celulares que expresan el marcador o los marcadores, e incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, "paneo" con anticuerpo unido a una matriz sólida (es decir, placa), y citometría de flujo (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.985.660; y Morrison et al., Cell, 96:737-49 (1999)).

Estas técnicas permiten la exploración de poblaciones particulares de células, como las que pueden encontrarse con

neoplasias hematológicas (es decir, enfermedad residual mínima (MRD) en pacientes con leucemia aguda) y células "no propias" en trasplantes para evitar la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). Como alternativa, estas técnicas permiten la exploración de células madre y progenitoras hematopoyéticas capaces de someterse a proliferación y/o diferenciación, tales como aquellas que pueden encontrarse en la sangre del cordón umbilical humano.

Ensayos de unión de anticuerpo

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para unión inmuno-específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, los sistemas de ensayo competitivo y no competitivo usando técnicas, tales como transferencia de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente asociado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinamiento, ensayos de fijación complementaria, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de proteína A, por nombrar solo algunos. Dichos ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Los inmunoensayos ejemplares se describen brevemente más adelante (pero no pretenden ser limitantes).

Los protocolos de inmunoprecipitación comprenden generalmente lisar una población de células en un tampón de lisis, tal como tampón RIPA (NP-40 al 1 % o Triton X-100, desoxicolato de sodio al 1 %, SDS al 0,1 %, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 mM a pH 7,2, Trasysol al 1 %) suplementado con fosfatasa de proteína y/o inhibidores de proteasas (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado de células, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4 °C, añadir perlas de sefarosa de proteína A y/o proteína G al lisado de células, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en SDS/tampón de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede determinarse mediante, por ejemplo, análisis por transferencia de Western. Un experto en la materia conocerá los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el fondo (por ejemplo, aclarando previamente el lisado celular con perlas de sefarosa). Para una discusión adicional referente a protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en el apartado 10.16.1.

Los análisis de transferencia de Western comprenden generalmente preparar muestras de proteínas, electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, SDS-PAGE al 8 %-20 % dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína desde el gel de poliacrilamida a una membrana, tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en solución de bloqueo (por ejemplo, PBS con BSA al 3 % o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce al anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado a un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o a una molécula radioactiva (por ejemplo, ^{32}P o ^{125}I) diluida en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia sabrá que parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para una discusión adicional referente a los protocolos de transferencia de Western véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en el apartado 10.8.1.

Los ELISA comprenden preparar el antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado a un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene por qué conjugarse a un compuesto detectable; sin embargo, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce al anticuerpo de interés) conjugado a un compuesto detectable. Además, en vez de recubrir el pocillo con el antígeno, el pocillo puede recubrirse con el anticuerpo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado a un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia sabrá que parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de los ELISA conocidas en la técnica. Para una discusión adicional referente a los ELISA véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en el apartado 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades en aumento de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las velocidades de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos mediante análisis de representación de Scatchard. También puede determinarse la unión con un segundo anticuerpo usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con anticuerpo de interés conjugado a un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia

de cantidades en aumento de un segundo anticuerpo no marcado.

Usos terapéuticos de anticuerpos

Además, en el presente documento se describen terapias basadas en anticuerpos que implican administrar anticuerpos de la invención a un animal, preferentemente un paciente mamífero, y lo más preferentemente ser humano, para tratar una o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones divulgadas. Los compuestos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos, tal como se describen en el presente documento) y ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la invención (incluyendo fragmentos, análogos y derivados de los mismos y anticuerpos anti-idiotípicos tal como se describen en el presente documento). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención, incluyendo, pero sin limitación, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos, o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención incluye, pero sin limitación, aliviar síntomas asociados con esas enfermedades, trastornos o afecciones. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como es conocido en la técnica o tal como se describe en el presente documento.

Un resumen de las formas en las que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse terapéuticamente incluye unir polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención localmente o sistémicamente en el organismo o mediante citotoxicidad directa del anticuerpo, por ejemplo, mediada por complemento (CDC) o por células efectoras (ADCC). Algunas de estas estrategias se describen en más detalle a continuación. Provistos con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la materia sabrá cómo usar los anticuerpos de la presente invención con fines diagnósticos, de control o terapéuticos sin experimentación innecesaria.

Los anticuerpos de esta invención pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7), por ejemplo, que sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Los anticuerpos de la invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, terapia de radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia o agentes antitumorales). En general, se prefiere la administración de productos de un origen de especies o reactividad de especies (en el caso de anticuerpos) que sea la misma especie que la del paciente. Por lo tanto, preferentemente, se administran anticuerpos humanos, fragmentos, derivados, análogos, o ácidos nucleicos a un paciente humano para terapia o profilaxis.

Se prefiere usar anticuerpos de alta afinidad y/o inhibición potente *in vivo* y/o neutralizantes contra polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención, fragmentos o regiones de los mismos, tanto para inmunoensayos dirigidos a y la terapia de trastornos relacionados con polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos, de la presente invención. Dichos anticuerpos, fragmentos, o regiones tendrán preferentemente una afinidad por los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, incluyendo fragmentos de los mismos. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d de menos de 5 x 10⁻² M, 10⁻² M, 5 X 10⁻³ M, 10⁻³ M, 5 X 10⁻⁴ M, 10⁻⁴ M, 5 X 10⁻⁵ M, 10⁻⁵ M, 5 X 10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5 X 10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5 X 10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5 X 10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5 X 10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5 X 10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5 X 10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5 X 10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5 X 10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5 X 10⁻¹⁵ M, y 10⁻¹⁵ M.

Los anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de la presente invención son útiles para inhibir reacciones alérgicas en animales. Por ejemplo, al administrar una dosis terapéuticamente aceptable de un anticuerpo, o anticuerpos, de la presente invención, o un cóctel de los presentes anticuerpos, o en combinación con otros anticuerpos de diversas fuentes, el animal puede no provocar una respuesta alérgica a antígenos.

Del mismo modo, se puede prever la clonación del gen que codifica un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la presente invención, teniendo dicho polipéptido el potencial de provocar una respuesta alérgica y/o inmunitaria en un organismo, y transformar el organismo con dicho gen de anticuerpo de tal forma que se expresa (por ejemplo, de manera constitutiva, de manera inducible, etc.) en el organismo. Por lo tanto, el organismo se hará resistente de manera eficaz a una respuesta alérgica que sea el resultado de la ingestión o la presencia de dicho polipéptido reactivo inmunogénico/alergénico. Además, dicho uso de los anticuerpos de la presente invención puede tener una utilidad particular para prevenir y/o mejorar enfermedades y/o trastornos autoinmunes, ya que dichas afecciones son normalmente el resultado de anticuerpos que se dirigen a proteínas endógenas. Por ejemplo, en el caso donde el polipéptido de la presente invención es responsable de modular la respuesta inmunitaria a autoantígenos, la transformación del organismo y/o del individuo con una construcción que comprende cualquiera de los promotores divulgados en el presente documento o conocidos de otro modo en la técnica, además de un polinucleótido que codifica el anticuerpo dirigido contra el polipéptido de la presente invención podría inhibir de manera eficaz la provocación de una respuesta inmunitaria del sistema inmunitario del organismo contra los autoantígenos. En otras partes del presente documento se proporcionan descripciones detalladas de aplicaciones terapéuticas y/o de terapia

génica de la presente invención.

Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención podrían producirse en una planta (por ejemplo, clonando el gen del anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la presente invención, y transformar una planta con un vector adecuado que comprende dicho gen para la expresión constitutiva del anticuerpo en la planta), y posteriormente ingerirse la planta por parte de un animal, proporcionando de este modo inmunidad temporal al animal para el antígeno específico hacia el que se dirige el anticuerpo (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 5.914.123 y 6.034.298).

Los anticuerpos de la presente invención, preferentemente anticuerpos policlonales, más preferentemente anticuerpos monoclonales, y lo más preferentemente anticuerpos monocatenarios, pueden usarse como un medio para inhibir la expresión génica de un gen o genes particulares, en un ser humano, mamífero, y/o otro organismo. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 00/05391, publicada el 03/02/2000, de Dow Agrosiences LLC. Se conoce en la técnica la aplicación de dichos métodos para los anticuerpos de la presente invención, y se describe más particularmente en otras partes del presente documento.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles para multimerizar los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, determinadas proteínas pueden conferir actividad biológica potenciada cuando están presentes en estado multimérico (es decir, dicha actividad potenciada puede deberse a la concentración eficaz aumentada de dichas proteínas, mediante la que más proteína está disponible en una ubicación localizada).

Terapia génica basada en anticuerpos

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos o derivados funcionales de los mismos pueden administrarse para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención, mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia efectuada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

Puede usarse cualquiera de los métodos de terapia génica disponibles en la técnica. Los métodos ejemplares se describen más adelante.

Para una revisión general de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993). Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993). Mayo, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

En un aspecto preferido, el compuesto comprende secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, formando parte dichas secuencias de ácido nucleico de vectores de expresión que expresan el anticuerpo o fragmentos o proteínas quiméricas o cadenas ligeras o pesadas de los mismos en un hospedador adecuado. En particular, dichas secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos operativamente a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En particular, pueden usarse secuencias de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de anticuerpo y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989). La molécula de anticuerpo expresada puede ser un anticuerpo monocatenario; como alternativa, las secuencias de ácido nucleico pueden incluir secuencias que codifican las cadenas tanto pesadas como ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

La administración de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser bien directa, en cuyo caso se expone directamente al paciente al ácido nucleico o a los vectores portadores de ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, primeramente se transforman las células con los ácidos nucleicos *in vitro*, y después se trasplantan al paciente. Estas dos estrategias se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácido nucleico pueden administrarse directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto puede lograrse mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de tal forma que se haga intracelular, por ejemplo, mediante infección usando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolística, Dupont), o recuperando con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolos unidos a un péptido que se sabe que entra al núcleo, administrándolo unido a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, *J. Biol.*

Chem. 262:4429-4432 (1987)) (que puede usarse para dirigirse a tipos celulares diana que expresan específicamente los receptores), etc. Pueden formarse complejos ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. El ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específica de células, dirigiendo un receptor específico (véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188, WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse al ADN de la célula hospedadora para su expresión mediante recombinación de homólogos (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

Específicamente, pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral y su integración en el ADN de la célula hospedadora. Las secuencias de ácido nucleico que codifican al anticuerpo que se van a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen a un paciente. Pueden encontrarse más detalles acerca de los vectores retrovirales en Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas para hacer a las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994). Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993).

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de manera natural los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar a células que no se encuentran en división. Kozarsky y Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143- 155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); publicación PCT WO94/12649; y Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Preferentemente, se usan vectores de adenovirus.

También se han propuesto virus adeno-asociados (VAA) para su uso en terapia génica (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993), patente de Estados Unidos N° 5.436.146).

Otra estrategia para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección viral. Generalmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador de selección a las células. Después se ponen a las células en selección para aislar a aquellas células que han captado y están expresando el gen transferido. Entonces se administran esas células a un paciente.

En este caso, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosas técnicas para la introducción de genes exógenos en células (véase, por ejemplo, Loeffler y Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993). Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993). Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985) y pueden usarse, siempre que no se alteren las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debe proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de tal forma que el ácido nucleico pueda expresarse por la célula y preferiblemente sea heredable y expresable por su descendencia celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un paciente mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células prevista para su uso depende del efecto deseado, del estado del paciente, etc., y puede determinarse por un experto en la materia.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico con fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular disponible deseado, e incluye, pero sin limitación, células epiteliales, células endoteliales queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas, tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, obtenidas de la médula ósea, de la sangre del cordón umbilical, de sangre periférica, de hígado fetal, etc.

Preferentemente, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente.

En los casos donde se usan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican un anticuerpo se introducen en las células de tal forma que pueden expresarse por las células o su descendencia, y después se administran las células recombinantes *in vivo* para el efecto terapéutico. Específicamente, pueden usarse células madre o progenitoras. Puede usarse potencialmente cualquier célula madre y/o progenitora que pueda aislarse y mantenerse *in vitro* (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); y Pittelkow y Scott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986)).

El ácido nucleico que se va a introducir con fines de terapia génica puede comprender un promotor inducible unido operativamente a la región codificante, de tal forma que pueda controlarse la expresión del ácido nucleico controlando la presencia o ausencia del inductor de la transcripción adecuado.

Demostración de la actividad terapéutica o profiláctica

Los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención se ensayan preferentemente *in vitro*, y después *in vivo* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de su uso en seres humanos. Por ejemplo, los ensayos *in vitro* para demostrar la utilidad terapéutica o profiláctica de un compuesto o composición farmacéutica incluyen el efecto de un compuesto en una línea celular o en una muestra de tejido del paciente. El efecto del compuesto o composición en la línea celular y/o muestra de tejido puede determinarse utilizando técnicas conocidas para los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, ensayos de formación de roseta y ensayos de lisis celular. De acuerdo con la invención, los ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar si la administración de un compuesto específico está indicada incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que se cultiva una muestra de tejido de un paciente y se expone o de otro modo se le administra un compuesto y se observa el efecto de dicho compuesto en la muestra de tejido.

Administración terapéutica/profiláctica y composiciones

Los métodos de tratamiento, inhibición y profilaxis mediante administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de la invención, preferentemente un anticuerpo de la invención, se describen en el presente documento. En un aspecto preferido, el compuesto está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es preferentemente un animal, incluyendo, pero sin limitación, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano.

Las formulaciones y métodos de administración que pueden emplearse cuando el compuesto comprende un ácido nucleico o una inmunoglobulina se han descrito anteriormente; las formulaciones y las rutas de administración adicionales adecuadas pueden seleccionarse entre aquellas descritas a continuación en el presente documento.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos o composiciones pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención por vía local a la zona que necesite tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, pero no como limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, de manera conjunta con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, incluyendo un anticuerpo de la invención, se tiene que tener cuidado de usar materiales en los que no se absorba la proteína.

En otra realización, el compuesto o composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibidem, páginas 317-327; véase de manera general el mismo).

En otra realización más, el compuesto o composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, anteriormente citado; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); véase también Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en proximidad con la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, anteriormente citado, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

En los casos donde el compuesto de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de tal forma que se haga intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos N°: 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolística, Dupont), o recubriendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo unido a un péptido similar a una caja homeostática que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)), etc. Como alternativa, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse al ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación de homólogos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o de un estado o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos cuyo origen es petróleo, animal, vegetal u origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propileno, glicoles, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse en forma de supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos adecuados de vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para su administración adecuada al paciente. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

Preferentemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En los casos necesarios, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se administran bien por separado o bien mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado o de concentrado sin agua en un envase herméticamente cerrado, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de agente activo. En los casos donde la composición se administra mediante infusión, puede administrarse en una botella para infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o suero salino de tal forma que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Los compuestos de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como aquellas derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes, tales como aquellas derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento, inhibición y prevención de una

enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Para anticuerpos, la dosis administrada a un paciente es normalmente de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosis administrada a un paciente es normalmente de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferentemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos exógenos. Por lo tanto, a menudo es posible una administración menor de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la invención pueden reducirse potenciando la captación y la penetración en tejido (por ejemplo, en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones, tales como, por ejemplo, lipidación.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Puede haber un aviso asociado opcionalmente a dicho envase de la manera prescrita por una organismo gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por el organismo para la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

Diagnóstico y obtención de imágenes con anticuerpos

Pueden usarse anticuerpos marcados y derivados y análogos de los mismos que se unen específicamente a un polipéptido de interés con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, o controlar enfermedades, trastornos, y/o afecciones asociados con la expresión y/o actividad aberrante de un polipéptido de la invención. La invención proporciona la detección de la expresión aberrante de un polipéptido de interés, que comprende (a) ensayar la expresión del polipéptido de interés en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido de interés; y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, mediante el que un aumento o disminución en el nivel de expresión génica del polipéptido ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de expresión aberrante.

La invención proporciona un ensayo diagnóstico para diagnosticar un trastorno, que comprende (a) ensayar la expresión del polipéptido de interés en células o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos específicos para el polipéptido de interés; y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, mediante el que un aumento o disminución en el nivel de expresión génica del polipéptido ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno particular. En referencia al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta de transcrito en tejido biopsiado de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o un tratamiento agresivo antes, evitando de este modo el desarrollo o una progresión mayor del cáncer.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para ensayar niveles proteicos en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, véase Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985). Jalkanen, et al., J. Cell Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores para ensayos de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I), ^{121}I , carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Un aspecto de la invención es la detección y el diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión aberrante de un polipéptido de interés en un animal, preferentemente un mamífero y más preferentemente un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: (a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, o intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de una molécula marcada que se une específicamente al polipéptido de interés; (b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto donde se expresa el polipéptido (y para que se elimine la molécula no unida hasta el nivel de fondo); (c) determinar el nivel de fondo; y (d) detectar la molécula marcada en el sujeto, de tal forma que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo indique que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno concreto asociado con la expresión aberrante del polipéptido de interés. El nivel de fondo puede determinarse mediante diversos métodos que incluyen comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor patrón determinado previamente para un sistema particular.

Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes determinará la cantidad de resto para obtención de imágenes necesaria para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ^{99m}Tc . El anticuerpo marcado o el fragmento de anticuerpo se acumulará entonces preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. La obtención de imágenes de tumor *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, incluyendo el tipo de marcador usado y del modo de administración, el intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y para que la molécula no unida se elimine hasta el nivel de fondo es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo después de la administración es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

En una realización, el control de la enfermedad o el trastorno se lleva a cabo repitiendo el método para diagnosticar la enfermedad o trastorno, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada puede detectarse en el paciente usando métodos conocidos en la técnica para el escaneo *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el método adecuado para detectar un marcador determinado. Los métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos diagnósticos de la invención incluyen, pero sin limitación, tomografía computarizada (TC), escáner de cuerpo completo, tal como tomografía de emisión de positrones (PET), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), y sonografía.

En una realización específica, la molécula se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., patente de Estados Unidos Nº 5.441.050). En otra realización, la molécula se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de escaneo que detecta fluorescencia. En otra realización, la molécula se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, la molécula se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Kits

La presente invención proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo de la invención, preferentemente un anticuerpo purificado, en uno o más envases. En una realización específica, los kits de la presente invención contienen un polipéptido sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo incluido en el kit. Preferentemente, los kits de la presente invención comprenden además un anticuerpo de control que no reacciona con el polipéptido de interés. En otra realización específica, los kits de la presente invención contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo a un polipéptido de interés (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse a un sustrato detectable, tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo puede conjugarse a un sustrato detectable).

En otra realización específica de la presente invención, el kit es un kit diagnóstico para su uso en la exploración de suero que contiene anticuerpos específicos contra polinucleótidos y polipéptidos proliferativos y/o cancerosos. Dicho kit puede contener un anticuerpo de control que no reacciona con el polipéptido de interés. Dicho kit puede incluir un antígeno polipeptídico sustancialmente aislado que comprende un epítipo que es específicamente inmunorreactivo con al menos un anticuerpo anti-antígeno polipeptídico. Además, dicho kit incluye medios para detectar la unión de dicho anticuerpo al antígeno (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse a un compuesto fluorescente, tal como fluoresceína o rodamina que pueden detectarse mediante citometría de flujo). En realizaciones específicas, el kit puede incluir un antígeno polipeptídico producido recombinantemente o químicamente sintetizado. El antígeno polipeptídico del kit también puede unirse a un soporte sólido.

En una realización más específica, los medios de detección del kit anteriormente descrito incluyen un soporte sólido al que se une dicho antígeno polipeptídico. Dicho kit también puede incluir un anticuerpo anti-humano marcado con indicador no unido. En esta realización, la unión del anticuerpo al antígeno polipeptídico puede detectarse mediante la unión del dicho anticuerpo marcado con indicador.

En una realización adicional, la invención incluye un kit diagnóstico para su uso en la exploración de suero que contiene antígenos del polipéptido de la invención. El kit diagnóstico incluye un anticuerpo sustancialmente aislado específicamente inmunorreactivo con antígenos polipeptídicos o polinucleotídicos, y medios para detectar la unión del antígeno polinucleotídico o polipeptídico al anticuerpo. En una realización, el anticuerpo está unido a un soporte sólido. En una realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. Los medios de detección del kit pueden incluir un segundo anticuerpo monoclonal marcado. Como alternativa, o además, los medios de detección

pueden incluir un antígeno marcado competitivo.

En una configuración diagnóstica, se hace reaccionar al suero de ensayo con un reactivo de fase sólida que tiene un antígeno unido a la superficie obtenido mediante los métodos descritos en el presente documento. Después de la unión con anticuerpo de antígeno específico al reactivo y de eliminar los componentes del suero no unidos mediante lavado, se hace reaccionar al reactivo con anticuerpo anti-humano marcado con indicador para que se una el indicador al reactivo en proporción a la cantidad de anticuerpo anti-antígeno unido sobre el soporte sólido. El reactivo se lava de nuevo para eliminar el anticuerpo marcado no unido, y se determina la cantidad de indicador asociado con el reactivo. Normalmente, el indicador es una enzima que se detecta incubando la fase sólida en presencia de un sustrato fluorométrico, luminiscente o colorimétrico adecuado (Sigma St. Louis, MO).

El reactivo de superficie sólida en el ensayo anterior se prepara mediante técnicas conocidas para unir material proteico a material de soporte sólido, tal como perlas poliméricas, tiras reactivas, placas de 96 pocillos o material de filtro. Estos métodos de unión incluyen generalmente la adsorción no específica de la proteína al soporte o la unión covalente de la proteína, normalmente mediante un grupo amino libre, a un grupo químicamente reactivo sobre el soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo, o aldehído activado. Como alternativa, pueden usarse placas recubiertas con estreptavidina conjuntamente con antígenos biotinilados.

Por lo tanto, la invención proporciona un sistema o kit de ensayo para llevar a cabo este método diagnóstico. El kit incluye generalmente un soporte con antígenos recombinantes unidos a la superficie, y un anticuerpo anti-humano marcado con indicador para detectar el anticuerpo anti-antígeno unido a la superficie.

Proteínas de fusión

Cualquier polipéptido de la presente invención puede usarse para generar proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención, cuando se fusiona a una segunda proteína, puede usarse como marcador antigénico. Pueden usarse anticuerpos provocados contra el polipéptido de la presente invención para detectar indirectamente la segunda proteína uniéndola al polipéptido. Además, debido a que determinadas proteínas se dirigen a localizaciones celulares basadas en el tráfico de señales, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse como moléculas de direccionamiento una vez fusionados a otras proteínas.

Los ejemplos de dominios que pueden fusionarse a polipéptidos de la presente invención incluyen no solo secuencias de señal heterólogas, sino también otras regiones funcionales heterólogas. La fusión no tiene por qué ser necesariamente directa, sino que puede suceder mediante secuencias enlazadoras.

Además, también pueden diseñarse proteínas de fusión para mejorar las características del polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia durante la purificación de la célula hospedadora o posterior manipulación y almacenamiento. Pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido. De manera similar, pueden introducirse sitios de escisión peptídica entre medias de dichos restos peptídicos, que pueden someterse adicionalmente a actividad de proteasa para eliminar dichos péptidos de la proteína de la presente invención. La adición de restos peptídicos, incluyendo sitios de escisión peptídicos, para facilitar la manipulación de polipéptidos es una técnica familiar y rutinaria en la técnica.

Además, los polipéptidos de la presente invención, incluyendo fragmentos, y específicamente epítopos, pueden combinarse con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM) o porciones de los mismos (CH1, CH2, CH3, y cualquier combinación de los mismos, incluyendo tanto dominios completos como porciones de los mismos), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una semivida *in vivo* aumentada. Un ejemplo comunicado describe proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y varios dominios de las regiones constantes de las cadenas ligeras o pesadas de inmunoglobulinas de mamífero. (Documento EP A 394.827; Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas unidas mediante disulfuros (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que la proteína monomérica secretada o que solo el fragmento de proteína. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)).

De manera similar, el documento EP-A 0 464 533 (homólogo canadiense 2.045.869) divulga proteínas de fusión que comprenden diversas porciones de la región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es beneficiosa para terapia y diagnóstico, y por lo tanto puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas. (Documento EP-A 0 232 262). Como alternativa, puede desearse eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión se haya expresado, detectado y purificado. Por ejemplo, la porción Fc puede impedir la terapia y el diagnóstico si la proteína de fusión se usa como antígeno para inmunizaciones. En el desarrollo de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas, tales como hIL-5, se han fusionado a porciones Fc con el propósito de desarrollar ensayos de exploración de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. (Véase, D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995)).

Además, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse a secuencias marcadoras (también citadas como "marcadores"). Debido a la disponibilidad de anticuerpos específicos para dichos "marcadores", la purificación del polipéptido fusionado de la invención y/o su identificación se facilita significativamente ya que no son necesarios anticuerpos específicos para los polipéptidos de la invención. Dicha purificación puede ser en forma de una purificación de afinidad mediante la cual está presente un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad (por ejemplo, anticuerpo anti-marcador unido a la matriz de una columna de flujo pasante) que se une al marcador epitópico. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otro marcador peptídico útil para la purificación, el marcador "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe. (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)).

El experto en la materia reconocerá la existencia de otros "marcadores" que puedan sustituirse fácilmente por los marcadores citados anteriormente para la purificación y/o identificación de polipéptidos de la presente invención (Jones C., et al., J Chromatogr A. 707(1):3-22 (1995)). Por ejemplo, el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4m B7 y 9E10 para esta (Evan et al., Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616 (1985)); el marcador de glucoproteína D (gD) del virus del *Herpes simplex* y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990), el péptido FLAG®, es decir, la secuencia de octapéptido DYKDDDDK (SEC ID N°: 56), (Hopp et al., Biotech. 6:1204-1210 (1988). el péptido del epítipo KT3 (Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)); el péptido del epítipo de α -tubulina (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15136-15166, (1991)); el marcador peptídico de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Sci. USA, 87:6363-6397 (1990)), el epítipo de FITC (Zymed, Inc.), el epítipo de GFP (Zymed, Inc.), y el epítipo de rodamina (Zymed, Inc.).

La presente invención también abarca la unión de hasta nueve codones que codifican una serie repetida de hasta nueve aminoácidos de arginina a la región codificante de un polinucleótido de la presente invención. La invención también abarca derivatizar químicamente un polipéptido de la presente invención con una serie repetida de hasta nueve aminoácidos de arginina. Dicho marcador, cuando se une a un polipéptido, se ha demostrado recientemente que sirve como paso universal, permitiendo que los compuestos accedan al interior de células sin derivatización o manipulación adicional (Wender, P., et al., datos no publicados).

Las fusiones proteicas que implican polipéptidos de la presente invención, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, pueden usarse para los siguientes ejemplos no limitantes, localización subcelular de proteínas, determinación de interacciones proteína-proteína mediante inmunoprecipitación, purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad, caracterización funcional y/o estructural de proteínas. La presente invención también abarca la aplicación de anticuerpos específicos de hapteno para cualquiera de los usos citados anteriormente para proteínas de fusión de epítipo. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención podrían derivatizarse químicamente para unirse a moléculas de hapteno (por ejemplo, DNP, (Zymed, Inc.)). Debido a la disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para dichos haptenos, la proteína podría purificarse fácilmente usando inmunoprecipitación, por ejemplo.

Los polipéptidos de la presente invención, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, además de anticuerpos dirigidos contra dichos polipéptidos, fragmentos, y/o variantes pueden fusionarse a un número cualquiera de toxinas conocidas y aún por determinar, tales como ricina, saporina (Mashiba H, et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 1999; 886:233-5), o toxina HC (Tonukari NJ, et al., Plant Cell. 2000 Feb; 12(2):237-248), por ejemplo. Dichas fusiones pueden usarse para administrar las toxinas a tejidos deseados para los que existe un ligando o una proteína capaz de unirse a los polipéptidos de la invención.

La invención abarca la fusión de anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de la presente invención, incluyendo variantes y fragmentos de los mismos, para dichas toxinas para administrar la toxina a localizaciones específicas en una célula, a tejidos específicos y/o especies específicas. Dichos anticuerpos bifuncionales se conocen en la técnica, aunque una revisión que describa fusiones ventajosas adicionales, incluyendo citas para métodos de producción, pueden encontrarse en P.J. Hudson, Curr. Opp. In. Imm. 11:548-557, (1999). En este contexto, el término "toxina" puede ampliarse para incluir cualquier proteína heteróloga, una molécula pequeña, radionucleótidos, fármacos citotóxicos, liposomas, moléculas de adhesión, glucoproteínas, ligandos, ligandos específicos de célula o tejido, enzimas, agentes bioactivos, modificadores de la respuesta biológica, agentes anti fúngicos, hormonas, esteroides, vitaminas, péptidos, análogos peptídicos, agentes anti-alérgicos, agentes antituberculares, agentes antivíricos, antibióticos, agentes anti-protozoos, quelatos, partículas radioactivas, iones radioactivos, agentes de contraste de rayos X, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y material genético. A la vista de la presente divulgación, un experto en la materia podría determinar si cualquier "toxina" particular podría usarse en los compuestos de la presente invención. Los ejemplos de "toxinas" adecuadas citados anteriormente son solo ejemplares y no se pretende que limiten las "toxinas" que pueden usarse en la presente invención.

Por lo tanto, cualquiera de estas fusiones anteriores puede diseñarse usando los polinucleótidos o los polipéptidos de la presente invención.

Vectores, células hospedadoras y producción de proteínas

La presente invención también se refiere a vectores que contienen los polinucleótidos de la presente invención, células hospedadoras, y la producción de proteínas mediante técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, virales, o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser competentes para replicación o defectuosos para replicación. En el último caso, la propagación viral sucederá generalmente únicamente en células hospedadoras complementarias.

Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contiene un marcador de selección para la propagación en un hospedador. En general, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular empaquetadora adecuada y después transducirse a células hospedadoras.

La inserción de polinucleótido debe unirse operativamente a un promotor adecuado, tal como el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar solo algunos. Los expertos en la materia conocerán otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio y la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosomas para la traducción. La porción codificante de los transcritos expresados por las construcciones incluirán preferentemente un codon de iniciación de la traducción al comienzo y un codon de terminación (UAA, UGA o UAG) posicionada adecuadamente en el extremo del polipéptido que se va a traducir.

Tal como se ha indicado, los vectores de expresión incluirán preferentemente al menos un marcador de selección. Dichos marcadores incluyen genes de resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para el cultivo de células eucariotas y de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedadores adecuados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y de *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (Nº de registro ATCC® 201178)); células de insecto, tales como células S2 de *Drosophila* y células Sf9 de *Spodoptera*; células animales, tales como células CHO, COS, 293, y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios y condiciones de cultivo adecuados para las células hospedadoras anteriormente descritas se conocen en la técnica.

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE9, disponibles a través de QIAGEN, Inc.; vectores PBLUESCRIPT®, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles a través de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles a través de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores de eucariotas preferidos se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles a través de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles a través de Pharmacia. Los vectores de expresión preferidos para su uso en sistemas de levadura incluyen, pero sin limitación, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5K, pPIC9K, y PA0815 (todos disponibles a través de Invitrogen, Carlsbad, CA). Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede efectuarse mediante transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos de la presente invención puedan de hecho expresarse por una célula hospedadora que carece de un vector recombinante.

Un polipéptido de esta invención puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Lo más preferentemente, se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación.

Los polipéptidos de la presente invención, y preferentemente la forma secretada, también puede recuperarse desde: productos purificados a partir de fuentes naturales, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células, ya sea aisladas directamente o cultivadas; productos de procedimientos sintéticos químicos; y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, levaduras, de plantas superiores, de insecto, y de mamífero. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glucosilados o no glucosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de metionina inicial modificado, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador. Por lo tanto, se sabe bien en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codon de iniciación de la traducción se retira con alta eficacia de cualquier proteína después de la traducción en todas las células eucariotas. Mientras que la metionina N-terminal en la mayoría de proteínas se elimina también de manera eficaz en la mayoría de procariotas, para algunas proteínas, este proceso de retirada procariótico es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al que la metionina N-terminal se une

covalentemente.

En una realización, se usa la levadura *Pichia pastoris* para expresar el polipéptido de la presente invención en un sistema eucariota. *Pichia pastoris* es una levadura metilotrófica que puede metabolizar el metanol como única fuente de carbono. Una etapa principal en la ruta de metabolización del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído usando O₂. Esta reacción está catalizada por la enzima alcohol oxidasa. Para metabolizar el metanol como su única fuente de carbono, la *Pichia pastoris* tiene que generar altos niveles de alcohol oxidasa debido, en parte, a la afinidad relativamente baja de alcohol oxidasa por el O₂. En consecuencia, en un medio de crecimiento que depende del metanol como principal fuente de carbono, la región promotora de uno de los dos genes de alcohol oxidasa (AOX1) es elevadamente activa. En presencia de metanol, la alcohol oxidasa producida a partir del gen AOX1 comprende hasta aproximadamente un 30 % de la proteína total soluble en *Pichia pastoris*. Véase, Ellis, S.B., et al., Mol. Cell. Biol. 5:1111-21 (1985). Koutz, P.J, et al., Yeast 5:167-77 (1989); Tschopp, J.F., et al., Nucl. Acids Res. 15:3859-76 (1987). Por lo tanto, una secuencia codificante heteróloga, tales como, por ejemplo, un polipéptido de la presente invención, bajo la regulación transcripcional de la totalidad o parte de la secuencia reguladora de AOX1 se expresa a niveles excepcionalmente altos en la levadura *Pichia* en presencia de metanol.

En un ejemplo, se usa el vector plasmídico pPIC9K para expresar ADN que codifica un polipéptido de la invención, tal como se expone en el presente documento, en un sistema de levadura de *Pichia* esencialmente tal como se describe en "Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology" D.R. Higgins y J. Cregg, eds. The Humana Press, Totowa, NJ, 1998. Este vector de expresión permite la expresión y secreción de una proteína de la invención por virtud del fuerte promotor AOX1 unido al péptido de señal secretorio de fosfatasa alcalina (PHO) de *Pichia pastoris* (es decir, el líder) ubicado cadena arriba de un sitio de clonación múltiple.

Pueden usarse otros muchos vectores de levadura en lugar de pPIC9K, tales como, pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalpha, pPIC9, pPIC3.5, pHIL-D2, pHIL-SI, pPIC3.5K, y PAO815, como apreciará fácilmente un experto en la materia, siempre que la construcción de expresión propuesta proporcione señales ubicadas de manera adecuada para la transcripción, traducción, secreción (si se desea), y similares, incluyendo un AUG en marco, según sea necesario.

En otra realización, puede lograrse un alto nivel de expresión de una secuencia codificante heteróloga, tales como, por ejemplo, un polipéptido de la presente invención, clonando el polinucleótido heterólogo de la invención en un vector de expresión, tal como, por ejemplo, pGAPZ o pGAPZalpha, y cultivar el cultivo de levadura en ausencia de metanol.

Además de abarcar células hospedadoras que contienen las construcciones de vector discutidas en el presente documento, la invención también abarca células hospedadoras primarias, secundarias, e inmortalizadas de origen de vertebrado, particularmente de origen de mamífero, que se han diseñado para eliminar o reemplazar material genético endógeno (por ejemplo, la secuencia codificante), y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias polinucleótidas heterólogas) que se asocia operativamente con los polinucleótidos de la invención, y que activa, altera y/o amplifica los polinucleótidos endógenos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas en la materia para asociar operativamente regiones de control heterólogas (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias polinucleótidas endógenas mediante recombinación de homólogos, dando como resultado la formación de una nueva unidad de transcripción (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.641.670, publicada el 24 de junio de 1997; la patente de Estados Unidos N° 5.733.761, publicada el 31 de marzo de 1998; la Publicación Internacional N° WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la Publicación Internacional N° WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)).

Además, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, véase Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y., y Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Por ejemplo, un polipéptido correspondiente a un fragmento de una secuencia polipeptídica de la invención puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador peptídico. Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como una sustitución o adición en la secuencia polipeptídica. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos diseñados, tales como aminoácidos de b-metilo, aminoácidos de Ca-metilo, aminoácidos de Na-metilo, y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

La invención abarca polipéptidos que se modifican de manera diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Puede llevarse a cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, la escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina;

etc.

Las modificaciones postraduccionales abarcadas por la invención incluyen, por ejemplo, por ejemplo, cadenas de carbohidrato unidas a N o unidas O, procesamiento de extremos N-terminales o C-terminales), unión de restos químicos a la estructura aminoacídica, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, y adición y eliminación de un resto de metionina N-terminal como resultado de la expresión celular de hospedador procarionota. Los polipéptidos también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y aislamiento de la proteína, la adición de fragmentos peptídicos marcados epitópicamente (por ejemplo, FLAG®, HA, GST, tiorredoxina, la proteína de unión a maltosa, etc.), unión de marcadores de afinidad, tales como biotina y/o estreptavidina, la unión covalente de restos químicos a la estructura aminoacídica, procesamiento N-o C- terminal de los extremos polipeptídicos (por ejemplo, procesamiento proteolítico), eliminación del resto de metionina N-terminal, etc.

La invención también proporciona derivados modificados químicamente de los polipéptidos de la invención que pueden proporcionar ventajas adicionales, tales como solubilidad, estabilidad y tiempo de circulación aumentados del polipéptido, o inmunogenicidad disminuida (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.179.337). Los restos químicos para derivatización pueden seleccionarse entre polímeros solubles en agua, tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico y similares. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones al azar dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y puede incluir una, dos, tres o más restos químicos unidos.

La invención abarca además la derivatización química de los polipéptidos de la presente invención, preferentemente en los casos donde el agente químico es un resto polimérico hidrófilo. Los polímeros hidrófilos ejemplares, incluyendo derivados, pueden ser aquellos que incluyen polímeros en los que las unidades repetidas contienen uno o más restos hidroxilo (polímeros de polihidroxilo), incluyendo, por ejemplo, poli(alcohol vinílico); polímeros en los que las unidades repetitivas contienen uno o más grupos amino (polímeros de poliamina), incluyendo, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas y lipoproteínas, tales como albúmina y lipoproteínas naturales; polímeros en los que las unidades repetitivas contienen uno o más grupos carboxilo (polímeros de policarboxilo), incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa, ácido algínico y sales de los mismos, tales como alginato de calcio y de sodio, glucosaminoglucanos y sales de los mismos, incluyendo sales de ácido hialurónico, derivados fosforilados y sulfonados de carbohidratos, material genético, tales como interleucina 2 e interferón, y oligómeros de fosforotioato; y polímeros en los que las unidades repetidas contienen uno o más restos de sacáridos (polímeros de polisacáridos), incluyendo, por ejemplo, hidratos de carbono.

El peso molecular de los polímeros hidrófilos puede variar, y es generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 5.000.000, prefiriéndose los polímeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 50.000. Los polímeros pueden ser ramificados o no ramificados. Los polímeros más preferidos tienen un peso molecular de aproximadamente 150 a aproximadamente 10.000, siendo aún más preferidos los pesos moleculares de 200 a aproximadamente 8.000.

Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido es de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, otras menos, que el peso molecular indicado) por facilidad en la manipulación y fabricación. Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, en caso de haberlos en la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína terapéutica o análogo).

Los polímeros preferidos adicionales que pueden usarse para derivatizar polipéptidos de la invención incluyen, por ejemplo, poli(etilenglicol) (PEG), poli(vinilpirrolidina), polioxómeros, polisorbato y poli(alcohol vinílico), prefiriéndose particularmente los polímeros de PEG. Entre los polímeros de PEG preferidos se encuentran los polímeros de PEG que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 100 hasta aproximadamente 10.000. Más preferentemente, los polímeros de PEG tienen un peso molecular de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 8.000, siendo aún más preferidos PEG 2.000, PEG 5.000 y PEG 8.000, que tienen pesos moleculares de 2.000, 5.000 y 8.000, respectivamente. Otros polímeros hidrófilos adecuados, además de aquellos ejemplificados anteriormente, serán fácilmente evidentes para un experto en la materia basándose en la presente divulgación. En general, los polímeros usados pueden incluir polímeros que pueden unirse a los polipéptidos de la invención mediante reacciones de alquilación o acilación.

Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deben unirse a la proteína teniendo en consideración los efectos de los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existe una serie de métodos de unión disponibles para los expertos en la materia, por ejemplo, documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (que comunica la pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Por ejemplo, puede unirse covalentemente polietilenglicol mediante restos de aminoácidos mediante un grupo reactivo, tales como, un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula activada de polietilenglicol. Los restos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir restos de lisina y los restos de aminoácidos N-terminales; aquellos que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir restos

de ácido aspártico, restos de ácido glutámico y el resto de aminoácido C-terminal. También pueden usarse grupos sulfhidrilo como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Para fines terapéuticos se prefiere la unión en un grupo amino, tal como la unión en el extremo N-terminal o grupo de lisina.

Se pueden desear específicamente proteínas modificadas químicamente en el extremo N-terminal. Usando polietilenglicol como una ilustración de la presente composición, se puede seleccionar entre diversas moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol a moléculas de proteína (polipéptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación a efectuar, y el método para obtener la proteína pegilada en N-terminal seleccionada. El método para obtener la preparación pegilada en N-terminal (es decir, separar este resto de otros restos monopegilados en caso necesario) puede ser mediante purificación del material pegilado en N-terminal entre una población de moléculas de proteína pegiladas. La modificación selectiva de proteínas modificadas químicamente en el extremo N-terminal puede lograrse mediante alquilación reductora que explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N-terminal) disponibles para derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción adecuadas, se logra sustancialmente la derivatización selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo.

Al igual que con los diversos polímeros ilustrados anteriormente, se contempla que los restos poliméricos puedan contener grupos funcionales además, por ejemplo, de aquellos implicados normalmente en la unión de los restos poliméricos a los polipéptidos de la presente invención. Dichas funcionalidades incluyen, por ejemplo, grupos carboxilo amina, hidroxilo y tiol. Estos grupos funcionales en los restos poliméricos pueden hacerse reaccionar adicionalmente, si se desea, con materiales que son generalmente reactivos con dichos grupos funcionales y que pueden asistir para dirigirse a tejidos específicos en el organismo incluyendo, por ejemplo, tejido enfermo. Los materiales ejemplares que pueden hacerse reaccionar con los grupos funcionales adicionales incluyen, por ejemplo, proteínas, incluyendo anticuerpos, hidratos de carbono, péptidos, glucopéptidos, glucolípidos, lectinas, y nucleósidos.

Además de restos de polímeros hidrófilos, el agente químico usado para derivatizar los polipéptidos de la presente invención pueden ser un resto de sacárido. Los sacáridos ejemplares que pueden derivarse incluyen, por ejemplo, monosacáridos o alcoholes de azúcar, tales como eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, fructosa, sorbitol, manitol y sedoheptulosa, siendo los monosacáridos preferidos fructosa, manosa, xilosa, arabinosa, manitol y sorbitol; y disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa. Otros sacáridos incluyen, por ejemplo, inositol y grupos de cabeza de gangliósido. Otros sacáridos adecuados, además de aquellos ejemplificados anteriormente, serán fácilmente evidentes para un experto en la materia basándose en la presente divulgación. En general, los sacáridos que pueden fusionarse para derivatización incluyen sacáridos que pueden unirse a los polipéptidos de la invención mediante reacciones de alquilación o acilación.

Además, la invención también abarca la derivatización de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, con agentes estabilizantes de lípidos (incluyendo catiónicos, aniónicos, polimerizados, cargados, sintéticos, saturados, insaturados y cualquier combinación de los anteriores, etc.).

La invención abarca la derivatización de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, con compuestos que pueden cumplir una función estabilizante (por ejemplo, para aumentar la semivida en solución de los polipéptidos, para hacer más solubles en agua a los polipéptidos, para aumentar el carácter hidrófilo o hidrófobo de los polipéptidos, etc.). Los polímeros útiles como materiales estabilizantes pueden ser de origen natural, semisintético (natural modificado) o sintético. Los polímeros naturales ejemplares incluyen polisacáridos de origen natural, tales como, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como, por ejemplo, inulina), levano, fucoidano, carragenano, galactocarolosa, ácido péctico, pectinas, incluyendo amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, glucosa, poliglucosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido alginico, goma xantana, almidón y varios otros homopolímeros o heteropolímeros naturales, tales como aquellos que contienen una o más de las siguientes aldosas, cetosas, ácidos o aminos: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, dextrosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrola, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagarosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galactourónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, y ácido neuramínico, y derivados de origen natural de los mismos. Por consiguiente, los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina, polialginatos, y polímeros de polilactida-coglicólido. Los polímeros semisintéticos ejemplares incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, y metoxicelulosa. Los polímeros sintéticos ejemplares incluyen polifosfacenos, hidroxipatitas, polímeros de fluoroapatita, polietilenos (tales como, por ejemplo, polietilenglicol (incluyendo, por ejemplo, la clase de compuestos citada como PLURONIC®, disponible comercialmente a través de BASF, Parsippany, N.J.), polioxietileno, y tereftalato de polietileno), polipropilenos (tales como, por ejemplo, propilenglicol), poliuretanos (tales como, por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA), cloruro de polivinilo y polivinilpirrolidona), poliamidas, incluyendo nailon, poliestireno, ácidos polilácticos, polímeros de hidrocarburos fluorados, polímeros de carbono fluorados (tales como, por ejemplo, politetrafluoroetileno), acrilato, metacrilato, y polimetilmetacrilato, y derivados de los mismos. Los métodos para la preparación de polipéptidos derivatizados de la invención que emplean polímeros como compuestos estabilizantes serán fácilmente evidentes

para un experto en la materia, a la vista de la presente divulgación, cuando se acopla información conocida en la técnica, tal como aquella descrita y citada en Unger, Patente de Estados Unidos N° 5.205.290.

Además, la invención abarca modificaciones adicionales de los polipéptidos de la presente invención. Dichas modificaciones adicionales se conocen en la técnica, y se proporcionan específicamente, además de métodos de derivatización, etc., en la Patente de Estados Unidos N° 6.028.066.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en monómeros o multímeros (es decir, dímeros, trímeros, tetrameros y multímeros superiores). Por consiguiente, la presente invención se refiere a monómeros y a multímeros de los polipéptidos de la invención, a su preparación, y a composiciones (preferentemente, agentes terapéuticos) que los contienen. En realizaciones específicas, los polipéptidos de la invención son monómeros, dímeros, trímeros o tetrameros. En realizaciones adicionales, los multímeros de la invención son al menos dímeros, al menos trímeros o al menos tetrameros.

Los multímeros abarcados por la invención pueden ser homómeros y heterómeros. Tal como se usa en el presente documento, el término homómero se refiere a un multímero que contiene solo polipéptidos correspondientes a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: Y o codificado por el ADNc contenido en un clon depositado (incluyendo fragmentos, variantes, variantes de corte y empalme, y proteínas de fusión, correspondientes a estos polipéptidos tal como se describe en el presente documento). Estos homómeros pueden contener polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. En una realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene solo polipéptidos que tienen una secuencia idéntica de aminoácidos. En otra realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene polipéptidos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En realizaciones específicas, el multímero de la invención es un homodímero (por ejemplo, que contiene polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes) o un homotrímero (por ejemplo, que contiene polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos idénticas y/o diferentes). En realizaciones adicionales, el multímero homomérico es al menos un homodímero, al menos un homotrímero, o al menos un homotetramero.

Tal como se usa en el presente documento, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, polipéptidos de diferentes proteínas) además de los polipéptidos de la invención. En una realización específica, el multímero de la invención es un heterodímero, un heterotrímero o un heterotetramero. En realizaciones adicionales, el multímero heteromérico de la invención es al menos un heterodímero, al menos un heterotrímero o al menos un heterotetramero.

Los multímeros de la invención pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden unirse indirectamente, mediante por ejemplo, formación de liposomas. Por lo tanto, en una realización, los multímeros de la invención, tales como, por ejemplo, homodímeros u homotrímeros, se forman cuando los polipéptidos de la invención se ponen en contacto entre sí en solución. En otra realización, los heteromultímeros de la invención, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrameros, se forman cuando los polipéptidos de la invención entran en contacto con anticuerpos para los polipéptidos de la invención (incluyendo anticuerpos para la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión de la invención) en solución. En otras realizaciones, los multímeros de la invención se forman mediante asociaciones covalentes con y/o entre los polipéptidos de la invención. Dichas asociaciones covalentes pueden implicar uno o más restos de aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica (por ejemplo, aquella recitada en el listado de secuencias, o contenida en el polipéptido codificado por un clon depositado). En un caso, las asociaciones covalentes son reticulación entre restos de cisteína localizados en las secuencias polipeptídicas que interactúan en el polipéptido nativo (es decir, de origen natural). En otro caso, las asociaciones covalentes son la consecuencia de la manipulación química o recombinante. Como alternativa, dichas asociaciones covalentes pueden implicar uno o más restos de aminoácidos contenidos en la secuencia polipeptídica heteróloga en una proteína de fusión de la invención.

En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión de la invención (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión de Fc de la invención (tal como se describe en el presente documento). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de proteínas de fusión de la invención son entre secuencias polipeptídicas heterólogas de otra proteína que es capaz de formar multímeros asociados covalentemente, tales como, por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 98/49305). En otra realización, se unen dos o más polipéptidos de la invención mediante enlaces peptídicos. Los ejemplos incluyen aquellos enlaces peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.073.627. Pueden producirse proteínas que comprenden múltiples polipéptidos de la invención separados por enlaces peptídicos usando tecnología de ADN recombinante convencional.

Otro método para preparar polipéptidos multiméricos de la invención implica el uso de polipéptidos de la invención fusionados a una secuencia polipeptídica de cremallera de leucina o de cremallera de isoleucina. Los dominios de cremallera de leucina y de cremallera de isoleucina son polipéptidos que promueven la multimerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz et al., Science 240:1759, (1988)), y desde entonces se han encontrado en diversas proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y los derivados de

los mismos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas multiméricas solubles de la invención son aquellos descritos en la solicitud PCT WO 94/10308. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido de la invención fusionado a una secuencia polipeptídica que dimeriza o trimeriza en solución se expresan en células hospedadoras adecuadas, y la proteína de fusión multimérica soluble resultante se recupera del sobrenadante de cultivo usando técnicas conocidas en la materia.

Los polipéptidos triméricos de la invención pueden ofrecer la ventaja de actividad biológica potenciada. Los restos de cremallera de leucina y los restos de isoleucina preferidos son aquellos que forman preferentemente trímeros. Un ejemplo es una cremallera de leucina derivada de proteína tensioactiva pulmonar D (SPD), tal como se describe en Hoppe et al., (FEBS Letters 344:191, (1994)) y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos con N° de Serie 08/446.922. Pueden emplearse otros péptidos derivados de proteínas triméricas de origen natural en la preparación de polipéptidos triméricos de la invención.

En otro ejemplo, las proteínas de la invención se asocian mediante interacciones entre la secuencia polipeptídica FLAG® contenida en proteínas de fusión de la invención que contienen secuencia polipeptídica FLAG®. En una realización adicional, las proteínas de asociación de la invención se asocian mediante interacciones entre la secuencia polipeptídica heteróloga contenida en las proteínas de fusión de FLAG® de la invención y anticuerpo anti-FLAG®.

Los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas químicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea que estén contenidos en los multímeros de la invención pueden reticularse químicamente usando moléculas enlazantes y técnicas de optimización de la longitud de la molécula enlazante conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925) Adicionalmente, los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas conocidas en la materia para formar una o más reticulaciones intermoleculares entre los restos de cisteína localizados en la secuencia de los polipéptidos que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925) Además, los polipéptidos de la invención pueden modificarse rutinariamente mediante la adición de cisteína o biotina al extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido y pueden aplicarse técnicas conocidas en la materia para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925) Adicionalmente, pueden aplicarse técnicas conocidas en la materia para generar liposomas que contienen los componentes polipeptídicos que se desea que estén contenidos en el multímero de la invención (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

Como alternativa, los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la materia. En una realización, los polipéptidos contenidos en los multímeros de la invención se producen de manera recombinante usando tecnología de proteínas de fusión descrita en el presente documento o conocida de otro modo en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925) En una realización específica, los polinucleótidos que codifican un homodímero de la invención se generan ligando una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de la invención con una secuencia que codifica un polipéptido enlazante y después adicionalmente a un polinucleótido sintético que codifica el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal (careciendo se la secuencia líder) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925) En otra realización, se aplican técnicas recombinantes descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para generar polipéptidos recombinantes de la invención que contienen un dominio transmembrana (o hidrófobo o de péptido de señal) y que puede incorporarse mediante técnicas de reconstitución de membrana en liposomas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.478.925).

Además, la inserción de polinucleótido de la presente invención podría unirse operativamente a promotores y factores de transcripción "artificiales" o quiméricos. Específicamente, el promotor artificial puede comprender, o como alternativa consistir en, cualquier combinación de elementos de secuencia de ADN que actúe en cis que se reconozcan por factores de transcripción que actúen en trans. Preferentemente, los elementos de secuencia de ADN que actúan en cis y los factores de transcripción que actúan en trans son operables en mamíferos. Además, los factores de transcripción que actúan en trans de dichos promotores "artificiales" también pueden ser "artificiales" o quiméricos en su propio diseño y pueden actuar como activadores o represores para dicho promotor "artificial".

Usos de los polinucleótidos

Cada uno de los polinucleótidos identificados en el presente documento puede usarse de muchas formas como reactivos. La siguiente descripción debe considerarse ilustrativa y utiliza técnicas conocidas.

Los polinucleótidos de la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. Existe una necesidad creciente para identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente hay pocos reactivos disponibles para marcación de cromosomas, basándose en los datos reales de secuencia (polimorfismos de repetición). Cada polinucleótido de la presente invención puede usarse como marcador de cromosomas.

En resumen, pueden mapearse secuencias para cromosomas preparando cebadores de PCR (preferentemente de 15-25 pb) a partir de las secuencias mostradas en SEC ID N°: X. Los cebadores pueden seleccionarse usando análisis

informático de tal forma que los cebadores no abarcan más de un exón predicho en el ADN genómico. Estos cebadores se usan posteriormente para la exploración PCR de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas humanos individuales. Solo aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente a SEC ID N°: X producirán un fragmento amplificado.

De manera similar, los híbridos somáticos proporcionan un método rápido para mapear por la PCR los polinucleótidos para cromosomas particulares. Pueden asignarse tres o más clones al día usando un solo ciclador termal. Además, puede lograrse la sublocalización de los polinucleótidos con paneles de fragmentos cromosómicos específicos. Otras estrategias de mapeo de genes que pueden usarse incluyen hibridación *in situ*, explorando previamente con cromosomas marcados clasificados por flujo, y preseleccionando mediante hibridación para construir bibliotecas de ADNc específicas de cromosoma.

La localización cromosómica precisa de los polinucleótidos también puede lograrse usando hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) o una dispersión cromosómica de metafase. Esta técnica usa polinucleótidos tan cortos como de 500 o 600 bases; sin embargo, se prefieren polinucleótidos de 2.000-4.000 pb. Para una revisión de esta técnica, véase Verma et al., "Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques" Pergamon Press, Nueva York (1988).

Para el mapeo de cromosomas, los polinucleótidos pueden usarse individualmente (para marcar un solo cromosoma o un solo sitio en ese cromosoma) o en paneles (para marcar múltiples sitios y/o múltiples cromosomas). Los polinucleótidos preferidos corresponden a las regiones no codificantes de los ADNc ya que las secuencias codificantes es más probable que estén conservadas dentro de las familias de genes, aumentando de este modo las posibilidades de hibridación cruzada durante el mapeo de cromosomas.

Una vez que se ha mapeado un polinucleótido en una localización cromosómica precisa, la posición física del polinucleótido puede usarse en análisis de unión. El análisis de unión establece la herencia conjunta entre una localización cromosómica y la presentación de una enfermedad particular. Los datos de mapeo de enfermedades se conocen la técnica. Asumiendo una resolución de mapeo de 1 megabase y un gen por cada 20 kb, un ADNc localizado de manera precisa en una región cromosómica asociada con la enfermedad será uno de 50-500 genes causantes potenciales.

Por lo tanto, una vez se ha establecido la herencia conjunta, pueden examinarse las diferencias en el polinucleótido y el gen correspondiente entre organismos afectados y no afectados. Primeramente, se examinan las alteraciones estructurales visibles en los cromosomas, tales como eliminaciones y traslocaciones, en dispersiones cromosómicas o mediante la PCR. Si no existiesen alteraciones estructurales, se determinaría la presencia de mutaciones puntuales. Las mutaciones observadas en algunos o todos los organismos afectados, pero no en los organismos normales, indican que la mutación puede causar la enfermedad. Sin embargo, la secuenciación completa del polipéptido y del gen correspondiente a partir de varios organismos normales es necesaria para distinguir la mutación de un polimorfismo. Si se identifica un nuevo polimorfismo, este polipéptido polimórfico puede usarse para análisis de unión adicional.

Además, la expresión aumentada o disminuida del gen en los organismos afectados en comparación con los organismos no afectados puede evaluarse usando polinucleótidos de la presente invención. Cualquiera de estas alteraciones (expresión alterada, reorganización cromosómica, o mutación) pueden usarse como marcador diagnóstico o pronóstico.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método diagnóstico útil durante el diagnóstico de una enfermedad, que implica medir el nivel de expresión de polinucleótidos de la presente invención en células o fluido corporal de un organismo y comparar el nivel de expresión génica medida con un nivel estándar de nivel de expresión de polinucleótidos, mediante el cual un aumento o una disminución en el nivel de expresión génica en comparación con el estándar es indicativo de un trastorno.

Al "medir el nivel de expresión de un polinucleótido de la presente invención" se pretende medir o estimar cualitativamente o cuantitativamente el nivel del polipéptido de la presente invención o el nivel de ARNm que codifica el polipéptido en una primera muestra biológica bien directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel absoluto de proteína (o el nivel de ARNm) o de manera relativa (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferentemente, el nivel de polipéptido o el nivel de ARNm en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con un nivel de polipéptido o nivel de ARN estándar, tomándose el estándar a partir de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándose promediando los niveles a partir de una población de organismos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce un nivel estándar de polipéptido o de ARNm, puede usarse repetidamente como estándar para comparación.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un organismo, fluidos corporales, línea celular, cultivo tisular, u otra fuente que contenga el polipéptido de la presente invención o ARNm. Tal como se ha indicado, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como los siguientes ejemplos no limitantes, esputo, fluido amniótico, orina, saliva, leche materna, secreciones, fluido intersticial, sangre, suero, fluido espinal, etc.) que

contiene el polipéptido de la presente invención, y otras fuentes de tejido que se encuentre que expresan el polipéptido de la presente invención. Los métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de organismos se conocen bien en la técnica. En los casos en los que la muestra biológica va a incluir ARNm, la fuente preferida es una biopsia de tejido.

Los métodos proporcionados anteriormente pueden aplicarse preferentemente en un método diagnóstico y/o kits en los que los polinucleótidos y/o los polipéptidos se unen a un soporte sólido. En un método ejemplar, el soporte puede ser una "microplaca génica" o una "microplaca biológica" tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.837.832, 5.874.219, y 5.856.174. Además, dicha microplaca génica con polinucleótidos de la presente invención unidos puede usarse para identificar polimorfismos entre las secuencias polinucleotídicas, con polinucleótidos aislados de un sujeto de ensayo. El conocimiento de dichos polimorfismos (es decir, su localización, así como su existencia) será beneficioso para identificar locus de enfermedades para muchos trastornos, incluyendo enfermedades y afecciones proliferativas. Dicho método se describe en las Patentes de Estados Unidos 5.858.659 y 5.856.104.

La presente invención abarca polinucleótidos de la presente invención que se sintetizan químicamente, o que se reproducen como ácidos peptidonucleicos (APN), o de acuerdo con otros métodos conocidos en la técnica. El uso de APN serviría como forma preferida si los polinucleótidos se incorporasen a un soporte sólido, o a una microplaca génica. Para los fines de la presente invención, un ácido peptidonucleico (APN) es un tipo de poliamida de análogo de ADN y las unidades monoméricas para adenina, guanina, timina y citosina están disponibles comercialmente (Perceptive Biosystems). Determinados componentes del ADN, tales como fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa no están presentes en los APN. Tal como se divulga por P.E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg y O. Buchardt, *Science* 254, 1497 (1991); y M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, y P. E. Nielsen, *Nature* 365, 666 (1993), los APN se unen específica y estrechamente a hebras de ADN complementarias y no se degradan por nucleasas. De hecho, el APN se une más fuertemente al ADN que el ADN en sí. Esto se debe probablemente a que no hay repulsión electrostática entre las dos hebras, y también a que la estructura de poliamida es más flexible. Debido a esto, los dúplex de APN/ADN se unen en un intervalo más amplio de condiciones de rigurosidad que los dúplex de ADN/ADN, haciendo más fácil llevar a cabo hibridación multiplexada. Pueden usarse sondas más pequeñas que con el ADN debido a las características de unión más fuertes de los híbridos de APN:ADN. Además, es más probable que puedan determinarse desemparejamientos de una sola base con la hibridación APN/ADN debido a que un solo desemparejamiento en un 15-mero de APN/ADN disminuye la temperatura de fusión (T_m) en 8-20 °C, frente a 4-16 °C para el 15-mero del dúplex de ADN/ADN. Asimismo, la ausencia de grupos cargados en el APN significa que la hibridación puede efectuarse a fuerzas iónicas bajas y reduce la posible interferencia por la sal durante el análisis.

Además de lo anterior, puede usarse un polinucleótido para controlar la expresión génica mediante la formación de triple hélice o mediante ADN o ARN antisentido. Las técnicas antisentido se discuten, por ejemplo, en Okano, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice se discute en, por ejemplo, Lee et al., *Nucleic Acids Research* 6: 3073 (1979); Cooney et al., *Science* 241: 456 (1988); y Dervan et al., *Science* 251: 1360 (1991). Ambos métodos se basan en la unión del polinucleótido a un ADN o ARN complementario. Para estas técnicas, los polinucleótidos preferidos son normalmente oligonucleótidos de 20 a 40 bases de longitud y complementarios bien con la región del gen implicado en la transcripción (triple hélice, véase Lee et al., *Nucl. Acids Res.* 6:3073 (1979); Cooney et al., *Science* 241:456 (1988); y Dervan et al., *Science* 251:1360 (1991)) o con el ARNm en sí (antisentido, Okano, J. *Neurochem.* 56:560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). La formación de triple hélice da como resultado de manera óptima una interrupción de la transcripción de ARN a partir de ADN, mientras que la hibridación con ARN antisentido bloquea la traducción de una molécula de ARNm en polipéptido. Ambas técnicas son eficaces en sistemas de modelo, y la información divulgada en el presente documento puede usarse para diseñar polinucleótidos antisentido o de triple hélice en un esfuerzo para tratar o prevenir enfermedades.

La presente invención abarca la adición de una señal de localización nuclear, unida operativamente al extremo 5', al extremo 3', o a cualquier localización en esta, de cualquiera de los oligonucleótidos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de triple hélice, ribozimas, oligonucleótidos de APN y/o polinucleótidos de la presente invención. Véase, por ejemplo, G. Cutrona, et al., *Nat. Biotech.*, 18:300-303, (2000).

Los polinucleótidos de la presente invención también son útiles en terapia génica. Un objetivo de la terapia génica es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectuoso, en un esfuerzo para corregir el defecto genético. Los polinucleótidos divulgados en la presente invención ofrecen un medio para dirigir dichos defectos genéticos de una manera muy precisa. Otro objetivo es insertar un nuevo gen que no estuviese presente en el genoma del hospedador, produciendo de este modo una nueva característica en la célula hospedadora. En un ejemplo, las secuencias polinucleotídicas de la presente invención pueden usarse para construir oligonucleótidos quiméricos de ARN/ADN que corresponden a dichas secuencias, diseñados específicamente para inducir mecanismos de reparación de desemparejamientos en un organismo tras la inyección sistémica, por ejemplo (Bartlett, R.J., et al., *Nat. Biotech.*, 18:615-622 (2000)). Dichos oligonucleótidos de ARN/ADN pueden diseñarse para corregir defectos genéticos en determinadas cepas hospedadoras, y/o para introducir fenotipos deseados en el hospedador (por ejemplo, introducción de un polimorfismo específico en un gen endógeno correspondiente a un polinucleótido de la presente invención que pueda mejorar y/o prevenir un síntoma de enfermedad y/o trastorno, etc.). Como alternativa, la

secuencia polinucleotídica de la presente invención puede usarse para construir oligonucleótidos bicatenarios correspondientes a dicha secuencia, diseñados específicamente para corregir defectos genéticos en determinadas cepas hospedadoras, y/o para introducir fenotipos deseados en el hospedador (por ejemplo, introducción de un polimorfismo específico en un gen endógeno correspondiente a un polinucleótido de la presente invención que pueda mejorar y/o prevenir un síntoma de enfermedad y/o trastorno, etc.). Dichos usos de oligonucleótidos bicatenarios se conocen en la técnica y están abarcados por la presente invención (véase el documento EP10077121).

Los polinucleótidos también son útiles para identificar organismos a partir de muestras biológicas diminutas. El Ejército de Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, el ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción, y se sonda en una transferencia de Southern para dar bandas únicas para identificar al personal. Este método no sufre las limitaciones de las "placas de identificación" que pueden perderse, intercambiarse o ser robadas, haciendo que la identificación positiva sea difícil. Los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse como marcadores de ADN adicionales para RFLP.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden usarse como una alternativa a la RFLP, determinando la secuencia de ADN real base a base de porciones seleccionadas del genoma de un organismo. Estas secuencias pueden usarse para preparar cebadores de PCR para amplificar y aislar dicho ADN seleccionado, que posteriormente puede secuenciarse. Usando esta técnica, se puede identificar a los organismos ya que cada organismo tendrá un único conjunto de secuencias de ADN. Una vez que se ha establecido una base de datos de ID única para un organismo, la identificación positiva de ese organismo, ya esté vivo o muerto, puede efectuarse a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas. De manera similar, los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse como marcadores de polimorfismos, además de para la identificación de células y/o tejidos transformados o no transformados.

También existe la necesidad de reactivos capaces de identificar la fuente de un tejido particular. Dicha necesidad surge, por ejemplo, cuando se presenta tejido de origen desconocido. Los reactivos adecuados pueden comprender, por ejemplo, sondas o cebadores de ADN específicos para tejidos particulares preparados a partir de las secuencias de la presente invención. Los paneles de dichos reactivos pueden identificar el tejido por especie y/o por tipo de órgano. De una manera similar, estos reactivos pueden usarse para explorar la contaminación de cultivos tisulares. Además, tal como se ha mencionado anteriormente, dichos reactivos pueden usarse para explorar y/o identificar células y/o tejidos transformados o no transformados.

Como mínimo, los polinucleótidos de la presente invención pueden usarse como marcadores de peso molecular en genes de Southern, como sondas diagnósticas para la presencia de un ARNm específico en un tipo celular particular, como sonda para "descartar" secuencias conocidas en el proceso de descubrimiento de nuevos polinucleótidos, para seleccionar y elaborar oligómeros para la unión a una "microplaca génica" u otro soporte, para provocar anticuerpos anti-ADN usando técnicas de inmunización de ADN, y como antígeno para producir una respuesta inmunitaria.

Usos de los polipéptidos

Cada uno de los polipéptidos identificados en el presente documento puede usarse de numerosas formas. La siguiente descripción debe considerarse ilustrativa y utiliza técnicas conocidas.

Un polipéptido de la presente invención puede usarse para ensayar niveles proteicos en una muestra biológica usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, puede estudiarse la expresión de proteínas en tejidos con métodos inmunohistológicos clásicos. (Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985). Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores para ensayos de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Además de para ensayar los niveles proteicos en una muestra biológica, las proteínas también pueden detectarse mediante obtención de imágenes *in vivo*. Los marcadores de anticuerpos para la obtención de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen aquellos detectables mediante radiografía X, RMN o ESR. Para la radiografía X, los marcadores adecuados incluyen radioisótopos, tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero que no son manifiestamente perjudiciales para el sujeto. Los marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que puede incorporarse en el anticuerpo marcando nutrientes para el hibridoma relevante.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de proteína que se ha marcado con un resto para obtención de imágenes detectable adecuado, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), una sustancia opaca a las radiaciones, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea, o intraperitoneal) en el mamífero. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el

sistema de obtención de imágenes determinará la cantidad de resto para obtención de imágenes necesaria para producir imágenes diagnósticas. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ^{99m}Tc . El anticuerpo marcado o el fragmento de anticuerpo se acumulará entonces preferentemente en la localización de células que contienen la proteína específica. La obtención de imágenes de tumor *in vivo* se describe en S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

Por lo tanto, la invención proporciona un método diagnóstico para un trastorno que implica (a) ensayar la expresión de un polipéptido de la presente invención en células o fluido corporal de un individuo; y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, mediante el que un aumento o disminución en el nivel de expresión génica del polipéptido ensayado en comparación con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno. En referencia al cáncer, la presencia de una cantidad relativamente alta de transcrito en tejido biopsiado de un individuo puede indicar una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o puede proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales de la salud emplear medidas preventivas o un tratamiento agresivo antes, evitando de este modo el desarrollo o una progresión mayor del cáncer.

Además, los polipéptidos de la invención pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una enfermedad. Por ejemplo, puede administrarse a los pacientes un polipéptido de la presente invención en un esfuerzo para reemplazar niveles ausentes o disminuidos del polipéptido (por ejemplo, insulina), para complementar niveles ausentes o disminuidos de un polipéptido diferente (por ejemplo, hemoglobina S para hemoglobina B, SOD, catalasa, proteínas de reparación de ADN), para inhibir la actividad de un polipéptido (por ejemplo, un oncogén o supresor tumoral), para activar la actividad de un polipéptido (por ejemplo, uniéndose a un receptor), para reducir la actividad de un receptor unido a membrana compitiendo con este por ligando libre (por ejemplo, receptores de TNF solubles usados en la reducción de la inflamación), o provocando una respuesta deseada (por ejemplo, inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos, potenciación de la respuesta inmunitaria a células o tejidos proliferativos).

De manera similar, también pueden usarse anticuerpos dirigidos a un polipéptido de la presente invención para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una enfermedad. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo dirigido a un polipéptido de la presente invención puede unir y reducir la sobreproducción del polipéptido. De manera similar, la administración de un anticuerpo puede activar al polipéptido, tal como mediante la unión a un polipéptido unido a una membrana (receptor).

Como mínimo, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse como marcadores de peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración en gel de tamiz molecular usando métodos bien conocidos para los expertos en la materia. También pueden usarse los polipéptidos para provocar anticuerpos, que a su vez pueden usarse para medir la expresión proteica para una célula recombinante, como modo para evaluar la transformación de la célula hospedadora. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para ensayar las siguientes actividades biológicas.

Métodos de terapia génica

En el presente documento se describen además métodos de terapia génica para tratar o prevenir trastornos, enfermedades y afecciones. Los métodos de terapia génica se refieren a la introducción de secuencias de ácido nucleico (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) en un animal para lograr la expresión de un polipéptido de la presente invención. Este método requiere que un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención que esté unido operativamente a un promotor y a cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido diana. Dichas técnicas de terapia y administración génica se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO 90/11092.

Por lo tanto, por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería genética *ex vivo* las células de un paciente con un polinucleótido (ADN o ARN) que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido de la invención, proporcionándose las células modificadas a un paciente que se va a tratar con el polipéptido. Dichos métodos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, véase Belldegrun et al., J. Natl. Cancer Inst., 85:207-216 (1993). Ferrantini et al., Cancer Research, 53:107-1112 (1993). Ferrantini et al., J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T., et al., Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura et al., Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, et al., Human Gene Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, et al., Gene Therapy 4:1246-1255 (1997); y Zhang, et al., Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)). Las células que se modifican pueden ser células arteriales. Las células arteriales pueden reintroducirse en el paciente mediante inyección directa a la arteria, a los tejidos circundantes a la arteria, o mediante inyección por catéter.

Tal como se discute en más detalle a continuación, las construcciones polinucleotídicas pueden administrarse mediante cualquier método que administre materiales inyectables a las células de un animal, tales como, inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, y similares). Las construcciones polinucleotídicas pueden administrarse en un vehículo líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

El polinucleótido de la invención puede administrarse como un polinucleótido desnudo. La expresión polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que están libres de cualquier vehículo de administración que actúe para asistir, promover o facilitar la entrada a la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes precipitantes y similares. Sin embargo, los polinucleótidos de la invención también pueden administrarse en formulaciones de liposomas y las formulaciones de lipofectina pueden prepararse mediante métodos bien conocidos para los expertos en la materia. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.593.972, 5.589.466, y 5.580.859.

Las construcciones de vector polinucleotídico de la invención usadas en el método de terapia génica son preferentemente construcciones que no se integrarán en el genoma del hospedador ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Los vectores adecuados incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles a través de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles a través de Pharmacia; y pEF1/V5, pcDNA3.1, y pRc/CMV2 disponibles a través de Invitrogen. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Puede usarse cualquier promotor fuerte conocido para los expertos en la materia para dirigir la expresión de las secuencias polinucleotídicas de la invención. Los promotores adecuados incluyen promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor de virus respiratorio sincitial (RSV); promotores inducibles, tales como el promotor MMT, el promotor de metalotienina; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; promotores de globina humanos; promotores de timidina cinasa viral, tales como el promotor de timidina cinasa de *Herpes simplex*; LTR retrovirales; el promotor de b-actina; y promotores de hormona de crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo para los polinucleótidos de la invención.

A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de introducir secuencias de ácido nucleico desnudas en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Los estudios han demostrado que puede introducirse secuencias no replicantes de ADN en células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

La construcción polinucleotídica de la invención puede administrarse al espacio intersticial de tejidos en el animal, incluyendo tejido de músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículos, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende la matriz intercelular fluida de mucopolisacárido entre las fibras reticulares de tejidos de órganos, fibras elásticas en las paredes de vasos o cámaras, fibras de colágeno o tejidos fibrosos, o la misma matriz en el tejido conectivo que envaina las células musculares o en las lagunas del hueso. Es de manera similar el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el fluido linfático de los canales linfáticos. La administración al espacio intersticial del tejido muscular se prefiere por los motivos discutidos a continuación. Pueden administrarse convenientemente mediante inyección a los tejidos que comprenden estas células. Se administran preferiblemente a y se expresan en células persistentes no en división que están diferenciadas, aunque puede lograrse la administración y la expresión en células no diferenciadas o diferenciadas de manera menos completa, tales como, por ejemplo, células madre de fibroblastos sanguíneos o de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para captar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de secuencia de ácido nucleico desnudo, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN se encontrará en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, la dosificación será de desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente de desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg. Por supuesto, como apreciará el experto habitual en la materia, esta dosificación variará de acuerdo con el sitio tisular de inyección. La dosificación adecuada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia y dependerá de la afección que se esté tratando y de la ruta de administración.

La ruta de administración preferida es la ruta parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también pueden usarse otras rutas parenterales, tales como, inhalación de una formulación de aerosol, particularmente para la administración a los pulmones o tejidos bronquiales, a la garganta o a las membranas mucosas de la nariz. Además, las construcciones de ADN desnudo pueden administrarse a las arterias durante la angioplastia por medio del catéter usado en el procedimiento.

Los polinucleótidos desnudos se administran mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inyección directa con aguja en el sitio de administración, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter, y las denominadas "pistolas génicas". Estos métodos de administración se conocen en la técnica.

Las construcciones también se pueden administrar con vehículos de administración, tales como secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, lipofectina, agentes precipitantes, etc. Dichos métodos de administración se conocen en la técnica.

Las construcciones polinucleotídicas de la invención pueden complejarse en una preparación de liposomas. Las preparaciones liposómicas para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Sin embargo, se prefieren particularmente los liposomas catiónicos debido a que puede formarse un complejo estrecho de carga entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianiónico. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos median la administración intracelular de ADN de plásmido (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7416 (1987)); ARNm (Malone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6077-6081 (1989)); y factores de transcripción purificados (Debs et al., J. Biol. Chem., 265:10189-10192 (1990)), en forma funcional.

Hay liposomas catiónicos fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) son particularmente útiles y están disponibles con el nombre comercial LIPOFECTIN®, de GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (Véase, también Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7416 (1987)). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer).

Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N°: WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). La preparación de liposomas de DOTMA se explica en la bibliografía, véase, por ejemplo, Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417. Pueden usarse métodos similares para preparar liposomas a partir de otros materiales lipídicos catiónicos.

De manera similar, hay fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros, tales como a través de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidilo, colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida de DOTMA y DOTAP en proporciones adecuadas. Los métodos para preparar liposomas usando estos materiales se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, pueden usarse la dioleoilfosfatidil colina (DOPC), el dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), y la dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE) comerciales en varias combinaciones para producir liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol. Por lo tanto, por ejemplo, pueden prepararse vesículas de DOPG/DOPC secando 50 mg de cada uno de DOPG y DOPC en corriente de nitrógeno gaseoso en un vial de sonicación. Se somete la muestra a una bomba de vacío durante toda la noche y se hidrata al día siguiente con agua desionizada. Después se sonica la muestra durante 2 horas en vial cerrado, usando un sonicador de Heat Systems modelo 350 equipado con una sonda de vaso invertido (de tipo baño) en el ajuste máximo mientras que se circula el baño a 15 °C. Como alternativa, pueden prepararse vesículas con carga negativa sin sonicación para producir vesículas multilamelares o mediante extrusión a través de membranas nucleopore para producir vesículas unilamelares de tamaño discreto. Se conocen otros métodos y están disponibles para los expertos en la materia.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV), prefiriéndose las SUV. Los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico se preparan usando métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger et al., Methods of Immunology, 101:512-527 (1983). Por ejemplo, pueden prepararse MLV que contienen ácido nucleico depositando una fina capa de fosfolípido en las paredes de un tubo de vidrio y posteriormente hidratándola con una solución del material que se va a encapsular. Las SUV se preparan mediante la sonicación extendida de las MLV para producir una población homogénea de liposomas unilamelares. El material que se va a atrapar se añade a una suspensión de MLV preformadas y después se sonica. Cuando se usan liposomas en contacto con lípidos catiónicos, la película lipídica seca se resuspende en una solución adecuada, tal como agua estéril o una solución tamponadora isotónica, tal como Tris/NaCl 10 mM, se sonica, y después se mezclan los liposomas preformados directamente con el ADN. El liposoma y el ADN forman un complejo muy estable debido a la unión de los liposomas cargados positivamente al ADN catiónico. Las SUV tienen uso con pequeños fragmentos de ácido nucleico. Las LUV se preparan mediante una serie de métodos bien conocidos en la técnica. Los métodos usados de manera común incluyen quelación con Ca^{2+} - EDTA (Papahadjopoulos et al., Biochim. Biophys. Acta, 394:483 (1975); Wilson et al., Cell, 17:77 (1979)); inyección de éter (Deamer et al., Biochim. Biophys. Acta, 443:629 (1976); Ostro et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 76:836 (1977); Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348 (1979)); diálisis en detergente (Enoch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:145 (1979)); y evaporación de fase reversa (REV) (Fraley et al., J. Biol. Chem., 255:10431 (1980); Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:145 (1978); Schaefer-Ridder et al., Science, 215:166 (1982)).

En general, la relación de ADN a liposomas será desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10. Preferentemente, la relación será desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5. Más preferentemente, la relación será de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3. Aún más preferentemente, la relación será de 1:1.

La Patente de Estados Unidos N°: 5.676.954 comunica la inyección de material genético en complejo con transportadores liposómicos catiónicos en ratones. las Patentes de los Estados Unidos con números 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional N°: WO

94/9469 proporcionan lípidos catiónicos para su uso en la transfección de ADN a células y mamíferos. Las Patentes de los Estados Unidos con números 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional N°: WO 94/9469 proporcionan métodos para administrar complejos ADN-lípido catiónico a mamíferos.

Las células pueden modificarse por ingeniería genética, *ex vivo* o *in vivo*, usando partículas retrovirales que contienen ARN que comprende una secuencia que codifica polipéptidos de la invención. Los retrovirus a partir de los cuales pueden derivarse los vectores plasmídicos retrovirales incluyen, pero sin limitación, virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la necrosis del bazo, virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia del mono gibbon, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma mieloproliferativo, y virus del tumor mamario.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir líneas celulares empaquetadoras para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células empaquetadoras que pueden transfectarse incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIIP, GP+E-86, GP+envAm12, y DAN tal como se describen en Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990). El vector puede transducir a las células empaquetadoras mediante cualquier medio conocido en la técnica. Dichos medios incluyen, pero sin limitación, electroporación, el uso de liposomas, y precipitación de CaPO₄. En una alternativa, el vector plasmídico retroviral puede encapsularse en un liposoma, o acoplarse a un lípido, y después administrarse a un hospedador.

La línea celular productora genera partículas de vector retroviral infecciosas que incluyen el polinucleótido que codifica los polipéptidos de la invención. Dichas partículas de vector retroviral pueden emplearse entonces para transducir células eucariotas, bien *in vitro* o *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán polipéptidos de la invención.

Las células pueden diseñarse, *ex vivo* o *in vivo*, con polinucleótidos de la invención contenidos en un vector de adenovirus. El adenovirus puede manipularse de tal forma que codifique y exprese polipéptidos de la invención, y a la vez esté inactivado en cuanto a su capacidad para replicarse en un ciclo vital viral lítico normal. La expresión de adenovirus se logra sin integración del ADN viral en el cromosoma de la célula hospedadora, aliviando de este modo las preocupaciones acerca de la mutagénesis insercional. Además, se han usado adenovirus como vacunas entéricas vivas durante muchos años con un perfil de seguridad excelente (Schwartz et al., Am. Rev. Respir. Dis., 109:233-238 (1974)). Finalmente, la transferencia génica mediada por adenovirus se ha demostrado en una serie de casos, incluyendo la transferencia de alfa-1-antitripsina y CFTR a los pulmones de ratas del algodón (Rosenfeld et al., Science, 252:431-434 (1991). Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155 (1992)). Además, los estudios extensivos para intentar establecer los adenovirus como un agente causante del cáncer humano fueron uniformemente negativos (Green et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:6606 (1979)).

Los vectores adenovirales adecuados útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel., 3:499-503 (1993). Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155 (1992). Engelhardt et al., Human Genet. Ther., 4:759-769 (1993). Yang et al., Nature Genet., 7:362-369 (1994). Wilson et al., Nature, 365:691-692 (1993); y la Patente de Estados Unidos N°: 5.652.224. Por ejemplo, el vector de adenovirus Ad2 es útil y puede hacerse crecer en células 293 humanas. Estas células contienen la región E1 de adenovirus y expresan constitutivamente E1a y E1b, lo que complementa a los adenovirus defectuosos proporcionando los productos de los genes eliminados del vector. Además de Ad2, otras variedades de adenovirus (por ejemplo, Ad3, Ad5, y Ad7) también son útiles en la presente invención.

Preferentemente, los adenovirus usados en la presente invención son deficientes para replicación. Los adenovirus deficientes en replicación necesitan la ayuda de un virus auxiliar y/o una línea celular empaquetadora para formar partículas infecciosas. El virus resultante es capaz de infectar células y puede expresar un polinucleótido de interés que está unido operativamente a un promotor, pero no puede replicarse en la mayoría de las células. Los adenovirus deficientes en replicación pueden eliminarse en uno o más o en una porción de los siguientes genes: E1a, E1b, E3, E4, E2a, o L1 hasta L5.

Las células pueden modificarse por ingeniería genética, *ex vivo* o *in vivo*, usando virus adeno-asociado (AAV). Los AAV son virus defectuosos de origen natural que necesitan de virus auxiliares para producir partículas infecciosas (Muzyczka, Curr. Topics in Microbiol. Immunol., 158:97 (1992)). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no están en división. Los vectores que contienen tan pocos como 300 pares de bases de AAV pueden empaquetarse y pueden integrarse, pero el espacio para ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Los métodos para producir y usar dichos AAV son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos con números 5.139.941, 5.173.414, 5.354.678, 5.436.146, 5.474.935, 5.478.745, y 5.589.377.

Por ejemplo, un vector AAV adecuado para su uso en la presente invención incluirá todas las secuencias necesarias para la replicación de ADN, su encapsidación, y su integración en la célula hospedadora. La construcción polinucleotídica que contiene los polinucleótidos de la invención se inserta en el vector AAV usando métodos de clonación estándar, tales como aquellos encontrados en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989). El vector AAV recombinante se transfecta entonces en células empaquetadoras que están infectadas con un virus auxiliar, usando cualquier técnica estándar, incluyendo lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, etc. Los virus auxiliares adecuados incluyen adenovirus, citomegalovirus, virus de

vaccinia o virus del herpes. Una vez que las células empaquetadoras se transfectan e infectan, producirán partículas virales de AAV infecciosas que contendrán la construcción polinucleotídica de la invención. Estas partículas virales se usan entonces para transducir células eucariotas, ya sea *ex vivo* o *in vivo*. Las células transducidas contendrán la construcción polinucleotídica integrada en su genoma, y expresarán el producto génico deseado.

Otro método de terapia génica implica asociar operativamente regiones de control heterólogas y secuencias polinucleotídicas endógenas (por ejemplo, que codifican la secuencia polipeptídica de interés) mediante recombinación de homólogos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.641.670, publicada el 24 de junio de 1997; la Publicación Internacional N° WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la Publicación Internacional N° WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra et al., Nature, 342:435-438 (1989). Este método implica la activación de un gen que está presente en las células diana, pero que normalmente no se expresa en las células, o se expresa a un nivel menor del deseado.

Las construcciones polinucleotídicas se preparan usando técnicas estándar conocidas en la materia, conteniendo el promotor con secuencias de direccionamiento que flanquean al promotor. Los promotores adecuados se describen en el presente documento. La secuencia de direccionamiento es lo suficientemente complementaria con una secuencia endógena como para permitir la recombinación de homólogos de la secuencia de direccionamiento del promotor con la secuencia endógena. La secuencia de direccionamiento estará lo suficientemente próxima al extremo 5' de la secuencia polinucleotídica endógena deseada de tal forma que el promotor estará unido operativamente a la secuencia homóloga tras la recombinación de homólogos.

Las secuencias promotoras y de direccionamiento pueden amplificarse usando la PCR. Preferentemente, el promotor amplificado contiene distintos sitios de restricción enzimática en los extremos 5' y 3'. Preferentemente, el extremo 3' de la primera secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de enzima de restricción que el extremo 5' del promotor amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado. El promotor amplificado y las secuencias de direccionamiento se digieren y ligan juntas.

La construcción de promotor-secuencia de direccionamiento se administra a las células, bien como un polinucleótido desnudo, o conjuntamente con agentes que facilitan la transfección, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, virus completos, lipofección, agentes precipitantes, etc., descritos en mayor detalle anteriormente. La secuencia de direccionamiento de promotor P puede administrarse mediante cualquier método, incluyendo inyección directa con aguja, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter, aceleradores de partículas, etc. Los métodos se describen en más detalle a continuación.

La construcción de promotor-secuencia de direccionamiento se capta por las células. La recombinación de homólogos entre la construcción y la secuencia endógena tiene lugar de tal forma que una secuencia endógena se sitúa bajo el control del promotor. El promotor dirige entonces la expresión de la secuencia endógena.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con otros polinucleótidos que codifican proteínas angiogénicas. Las proteínas angiogénicas incluyen, pero sin limitación, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos o básicos, VEGF-1, VEGF-2 (VEGF-C), VEGF-3 (VEGF-B), factor de crecimiento epidérmico alfa y beta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento insulínico, factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos, y sintasa de óxido nítrico.

Preferentemente, el polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención contiene una secuencia de señal secretoria que facilita la secreción de la proteína. Normalmente, la secuencia de señal se sitúa en la región codificante del polinucleótido que se va a expresar en dirección al extremo 5' de la región codificante. La secuencia de señal puede ser homóloga o heteróloga para el polinucleótido de interés y puede ser homóloga o heteróloga para las células que se van a transfectar. Adicionalmente, la secuencia de señal puede sintetizarse químicamente usando métodos conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquier modo de administración de cualquiera de las construcciones de polinucleótidos anteriormente descritas siempre que el modo de como resultado la expresión de una o más moléculas en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Esto incluye inyección directa con aguja, inyección sistémica, infusión por catéter, inyectores biológicos, aceleradores de partículas (es decir, "pistolas génicas"), depósitos de esponja de espuma de gel, otros materiales de depósito comercialmente disponibles, bombas osmóticas (por ejemplo, minibombas ALZA®), formulaciones farmacéuticas sólidas orales o en supositorio (comprimido o píldora), y aplicaciones por decantación o tópicas durante la cirugía. Por ejemplo, la inyección directa de plásmido desnudo precipitado por fosfato de calcio en hígado de rata y bazo de rata o un plásmido recubierto con proteína en la vena porta ha dado como resultado la expresión génica del gen exógeno en los hígados de rata. (Kaneda et al., Science, 243:375 (1989)).

Un método preferido de administración local es mediante inyección directa. Preferentemente, una molécula recombinante de la presente invención complejada con un vehículo de administración se administra mediante inyección directa o localmente en el área de las arterias. La administración de una composición localmente en el área de las arterias se refiere a inyectar la composición a centímetros y preferentemente milímetros de las arterias.

Otro método de administración local es poner en contacto una construcción polinucleotídica de la presente invención en o alrededor de una herida quirúrgica. Por ejemplo, un paciente puede someterse a terapia y la construcción polinucleotídica puede recubrirse sobre la superficie de tejido dentro de la herida o puede inyectarse la construcción en zonas de tejido dentro de la herida.

Las composiciones terapéuticas útiles en la administración sistémica incluyen moléculas recombinantes de la presente invención en complejo con un vehículo de administración dirigida de la presente invención. Los vehículos de administración adecuados para su uso con administración sistémica comprenden liposomas que comprenden ligandos para dirigir el vehículo a un tejido particular.

Los métodos preferidos de administración sistémica incluyen inyección intravenosa, administración de aerosol, oral y percutánea (tópica). Las inyecciones intravenosas pueden efectuarse usando métodos convencionales en la técnica. La administración de aerosol también puede efectuarse usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 189:11277-11281 (1992)). La administración oral puede efectuarse complejando una construcción polinucleotídica de la presente invención con un vehículo capaz de soportar la degradación mediante enzimas digestivas en el intestino del animal. Los ejemplos de dichos vehículos, incluyen cápsulas plásticas o comprimidos, tales como aquellos conocidos en la técnica. La administración tópica puede efectuarse mezclando una construcción polinucleotídica de la presente invención con un reactivo lipófilo (por ejemplo, DMSO) que es capaz de atravesar la piel.

La determinación de una cantidad eficaz de sustancia para su administración puede depender de una serie de factores que incluyen, por ejemplo, la estructura química y la actividad biológica de la sustancia, la edad y el peso del animal, la afección específica que requiera tratamiento y su gravedad, y la vía de administración. La frecuencia de los tratamientos depende de una serie de factores, tales como la cantidad de construcciones polinucleotídicas administradas por dosis, así como la salud y el historial del sujeto. La cantidad precisa, el número de dosis, y la pauta de las dosis se determinará por el médico o veterinario tratante. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a cualquier animal, preferentemente a mamíferos y pájaros. Los mamíferos preferidos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado, caballos y cerdos, prefiriéndose particularmente los seres humanos.

Actividades biológicas

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento pueden usarse en ensayos para ensayar una o más actividades biológicas. Si estos polinucleótidos y polipéptidos muestran actividad en un ensayo particular, es probable que estas moléculas puedan estar implicadas en las enfermedades asociadas con la actividad biológica. Por lo tanto, los polinucleótidos o polipéptidos, o los agonistas o antagonistas pueden usarse para tratar la enfermedad asociada.

Actividad inmune

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento pueden ser útiles para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades, trastornos, y/o afecciones del sistema inmunitario, activando o inhibiendo la proliferación, diferenciación, o movilización (quimiotaxis) de las células inmunitarias. Las células inmunitarias se desarrollan mediante un proceso denominado hematopoyesis, produciendo células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos sanguíneos, neutrófilos, y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T) a partir de células madre pluripotentes. La etiología de estas enfermedades, trastornos, y/o afecciones inmunitarias puede ser genética, somática, tal como cáncer o algunas enfermedades, trastornos, y/o afecciones autoinmunes, adquirida (por ejemplo, mediante quimioterapia o toxinas), o infecciosa. Además, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento pueden usarse como marcador o detector de una enfermedad o trastorno del sistema inmune particular.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento pueden ser útiles para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades, trastornos, y/o afecciones de células hematopoyéticas. Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento, pueden usarse para aumentar la diferenciación y la proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotentes, en un esfuerzo para tratar o prevenir esas enfermedades, trastornos, y/o afecciones asociadas con una disminución en determinados (o muchos) tipos de células hematopoyéticas. Los ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero sin limitación: enfermedades, trastornos y/o afecciones de proteínas sanguíneas (por ejemplo, agammaglobulinemia, disgamaglobulinemia), ataxia, telangiectasia, inmunodeficiencia variable común, síndrome de DiGeorge, infección por VIH, infección por HTLV-BLV, síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos, linfopenia, disfunción bactericida

de fagocitos, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), trastorno de Wiskott-Aldrich, anemia, trombocitopenia, o hemoglobulinuria.

Además, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento también podrían usarse para modular la actividad hemostática (detención de las hemorragias) o la formación trombolítica (formación de coágulos). Por ejemplo, al aumentar la actividad hemostática o trombolítica, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento podrían usarse para prevenir enfermedades, trastornos, y/o afecciones de la coagulación de la sangre (por ejemplo, afibrinogenemia, deficiencias de factores, trombosis arterial, trombosis venosa, etc.), enfermedades, trastornos y/o afecciones de las plaquetas de la sangre (por ejemplo, trombocitopenia), o heridas resultantes de un traumatismo, cirugía, u otras causas. Como alternativa, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento que pueden disminuir la actividad hemostática o trombolítica pueden usarse para inhibir o disolver la formación de coágulos. Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento también pueden ser útiles para la detección, pronóstico, tratamiento, y/o prevención de los ataques al corazón (infarto), ictus, formación de cicatrices, fibrinólisis, sangrado incontrolado, coagulación incontrolada, fijación de complemento incontrolada y/o inflamación.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento pueden ser útiles también para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades trastornos, y/o afecciones autoinmunes. Muchas enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes son el resultado del reconocimiento inadecuado del material propio como extraño por las células inmunitarias. Este reconocimiento inadecuado da como resultado una respuesta inmunitaria que da lugar a la destrucción del tejido del hospedador. Por lo tanto, la administración de polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o de los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento que inhiben una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación, o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz para prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes.

Los ejemplos de enfermedades, trastornos y/o afecciones autoinmunes que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse o detectarse mediante la presente invención incluyen, pero sin limitación: enfermedad de Addison, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípidos, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, miastenia grave, neuritis, oftalmia, penfigoide buloso, pénfigo, poliendocrinopatías, púrpura, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, tiroiditis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus insulín dependiente, y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune.

De manera similar, las reacciones y afecciones alérgicas, tales como asma (particularmente asma alérgica) u otros problemas respiratorios también pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento. Además, estas moléculas pueden usarse para tratar la anafilaxia, la hipersensibilidad a una molécula antigénica, o la incompatibilidad de grupo sanguíneo.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento pueden usarse también para tratar, prevenir, y/o diagnosticar el rechazo de órganos o la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). El rechazo de órganos mediante la destrucción por parte de las células inmunes del hospedador del tejido trasplantado mediante una respuesta inmune. De manera similar, también hay una respuesta inmune en la GVHD, pero, en este caso, las células inmunes exógenas trasplantadas destruyen los tejidos del hospedador. La administración de polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o de los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento que inhiben una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación, o quimiotaxis de linfocitos T, puede ser una terapia eficaz para prevenir el rechazo de órganos o la GVHD.

De manera similar, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento pueden usarse también para modular la inflamación. Por ejemplo, el polipéptido o polinucleótido o los agonistas o antagonistas pueden inhibir la proliferación y la diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria. Estas moléculas pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar afecciones inflamatorias, afecciones tanto crónicas como agudas, incluyendo prostatitis crónica, prostatitis granulomatosa y malacoplaquia, inflamación asociada con la infección (por ejemplo, choque séptico, septicemia, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), lesión por isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, artritis, rechazo hiperagudo mediado por complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocinas o quimiocinas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, o que sean el resultado de la sobreproducción de citocinas (por ejemplo, TNF o IL-1).

Trastornos hiperproliferativos

Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento

pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas, incluyendo neoplasias. Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento, pueden inhibir la proliferación del trastorno mediante interacciones directas o indirectas. Como alternativa, los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento, pueden proliferar otras células que pueden inhibir el trastorno hiperproliferativo.

Por ejemplo, al aumentar la respuesta inmune, particularmente al aumentar las cualidades antigénicas del trastorno hiperproliferativo o proliferando, diferenciando o movilizando linfocitos T, las enfermedades, trastornos, y/o afecciones hiperproliferativas pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse. Esta respuesta inmunitaria puede aumentarse bien potenciando una respuesta inmune existente, o iniciando una nueva respuesta inmune. Como alternativa, la disminución de una respuesta inmune también puede ser un método para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades, trastornos, y/o afecciones hiperproliferativas, tal como un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de enfermedades, trastornos, y/o afecciones hiperproliferativas que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento incluyen, pero sin limitación, neoplasias localizadas en el colon, abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenales, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, nervios (centrales y periféricos), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax, y aparato urogenital.

De manera similar, otras enfermedades, trastornos, y/o afecciones hiperproliferativas también pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento. Los ejemplos de dichas enfermedades, trastornos, y/o afecciones hiperproliferativas incluyen, pero sin limitación: hipergammaglobulinemia, enfermedades, trastornos, y/o afecciones linfoproliferativas, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de Gaucher, histiocitosis, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, aparte de una neoplasia, localizada en un sistema de órganos listado anteriormente.

Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención se utilizan para inhibir la división celular aberrante, mediante terapia génica usando la presente invención, y/o fusiones de proteínas o fragmentos de las mismas.

Por lo tanto, las enfermedades, trastornos, y/o afecciones proliferativas celulares pueden tratarse o prevenirse insertando en una célula que prolifera de manera anormal un polinucleótido de la presente invención, en la que dicho polinucleótido reprime dicha expresión.

Además, en el presente documento se describe un método para tratar o prevenir enfermedades, trastornos y/o afecciones proliferativas celulares, comprendiendo el método la administración de una o más copias activas de genes de la presente invención a una célula o células que proliferan de manera anormal. Preferentemente, el polinucleótido de la presente invención es una construcción de ADN que comprende un vector de expresión recombinante eficaz en la expresión de una secuencia de ADN que codifica dichos polinucleótidos. Preferentemente, la construcción de ADN que codifica los polinucleótidos de la presente invención se inserta en células que van a tratarse utilizando un retrovirus, o más preferentemente un vector adenoviral (véase G J. Nabel, et al., PNAS 1999/96; 324-326): Lo más preferentemente, el vector viral es defectuoso y no transformará a las células que no estén en proliferación, solo a las células en proliferación. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención insertados en células en proliferación bien solos, o en combinación con o fusionados a otros polinucleótidos, pueden modularse entonces mediante un estímulo externo (es decir, administración de una molécula pequeña magnética específica, un agente químico o fármaco, etc.), que actúa sobre el promotor aguas arriba de dichos polinucleótidos para inducir la expresión del producto proteico codificado. Como tal, el efecto terapéutico beneficioso del método descrito puede modularse expresamente (es decir, para aumentar, disminuir, o inhibir la expresión de la presente invención) basándose en dichos estímulos externos.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden ser útiles para reprimir la expresión de genes o antígenos oncogénicos. Por "reprimir la expresión de los genes oncogénicos" se entiende la supresión de la transcripción del gen, la degradación del transcrito génico (ARN pre-mensajero), la inhibición del corte y empalme, la destrucción del ARN mensajero, la prevención de las modificaciones postraduccionales de la proteína, la destrucción de la proteína, o la inhibición de la función normal de la proteína.

Para la administración local a células que proliferan anormalmente, los polinucleótidos de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier método conocido para los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección de células, o en vehículos, tales como liposomas, lipofectina, o como polinucleótidos desnudos, o cualquier otro método descrito a lo largo de la memoria descriptiva. El polinucleótido de la presente invención puede administrarse mediante sistemas de administración génica conocidos, tales como, pero sin limitación, vectores retrovirales (Gilboa, J. Virology 44:845 (1982); Hocke, Nature 320:275 (1986); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:3014), sistema de virus vaccinia (Chakrabarty et al., Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985) u otros sistemas eficaces de administración de ADN (Yates et al., Nature 313:812 (1985)) conocidos

para los expertos en la materia. Estas referencias son solo ilustrativas. Para administrar específicamente o transfectar células que están proliferando anormalmente y no en células que no estén en división, es preferible utilizar un sistema de administración de retrovirus o adenoviral (tal como se describe en la técnica y en otras partes del presente documento) conocidos para los expertos en la materia. Ya que se necesita la replicación del ADN del hospedador para que el ADN retroviral se integre, el retrovirus será incapaz de replicarse por sí mismo debido a la ausencia de genes de retrovirus necesarios para su ciclo celular. El uso de dicho sistema de administración retroviral para los polinucleótidos de la presente invención dirigirá a dichas construcciones génicas a células que estén proliferando anormalmente y no a células normales que no estén en división.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden administrarse directamente a sitios de trastorno/enfermedad proliferativa celular en órganos internos, cavidades corporales y similares mediante el uso de dispositivos de obtención de imágenes empleados para guiar una aguja de inyección directamente en el sitio de enfermedad. Los polinucleótidos de la presente invención también pueden administrarse a sitios de enfermedad en el momento de la intervención quirúrgica.

Por "enfermedad proliferativa celular" se entiende cualquier enfermedad o trastorno humano o animal, afectando a uno cualquiera o a cualquier combinación de órganos, cavidades o partes del cuerpo, que está caracterizada por la proliferación anormal local simple o múltiple de células, grupos de células o tejidos, ya sea benigno o maligno.

Puede administrarse cualquier cantidad de los polinucleótidos de la presente invención siempre que tenga efecto inhibidor biológico en la proliferación de las células tratadas. Además, es posible administrar más de uno de los polinucleótidos de la presente invención en el mismo sitio. Por "inhibir biológicamente" se entiende la inhibición parcial o total del crecimiento así como la disminución en la velocidad de proliferación o crecimiento de las células. La dosis biológicamente inhibidora puede determinarse evaluando los efectos de los polinucleótidos de la presente invención en células malignas o que proliferan anormalmente crecidas en cultivo de tejidos, crecimiento tumoral en animales y cultivos celulares, o cualquier otro método conocido para un experto habitual en la materia.

Además, en el presente documento se describen terapias basadas en anticuerpos que implican la administración de anticuerpos anti-polipéptidos y anti-polinucleótidos a un paciente mamífero, preferentemente seres humanos, para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una o más de las enfermedades, trastornos, y/o afecciones descritas. Los métodos para producir anticuerpos monoclonales y policlonales anti-polipéptidos y anti-polinucleótidos se describen en detalle en otras partes del presente documento. Dichos anticuerpos pueden producirse en composiciones farmacéuticamente aceptables, tal como se conoce en la técnica o tal como se describe en el presente documento.

Un resumen de las formas en las que los anticuerpos de la presente invención pueden usarse terapéuticamente incluye unir polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención localmente o sistémicamente en el organismo o mediante citotoxicidad directa del anticuerpo, por ejemplo, mediada por complemento (CDC) o por células efectoras (ADCC). Algunas de estas estrategias se describen en más detalle a continuación. Provistos con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la materia sabrá cómo usar los anticuerpos de la presente invención con fines diagnósticos, de control o terapéuticos sin experimentación innecesaria.

En particular, los anticuerpos, fragmentos y derivados de la presente invención son útiles para tratar, prevenir, y/o diagnosticar a un sujeto que tiene o está desarrollando enfermedades, trastornos, y/o afecciones de la diferenciación y/o proliferación celular tal como se describen en el presente documento. Dicho tratamiento comprende administrar una sola o múltiples dosis del anticuerpo, o un fragmento, derivado, o conjugado del mismo.

Los anticuerpos de esta invención pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo, que sirven para aumentar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos.

Se prefiere usar anticuerpos de alta afinidad y/o inhibición potente *in vivo* y/o neutralizantes contra polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención, fragmentos o regiones de los mismos, tanto para inmunoensayos dirigidos a y terapia de enfermedades, trastornos, y/o afecciones relacionadas con polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos, de la presente invención. Dichos anticuerpos, fragmentos, o regiones tendrán preferentemente una afinidad por los polinucleótidos o polipéptidos, incluyendo fragmentos de los mismos. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación K_d menor de $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-6}M$, $5 \times 10^{-7}M$, $10^{-7}M$, $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $5 \times 10^{-10}M$, $10^{-10}M$, $5 \times 10^{-11}M$, $10^{-11}M$, $5 \times 10^{-12}M$, $10^{-12}M$, $5 \times 10^{-13}M$, $10^{-13}M$, $5 \times 10^{-14}M$, $10^{-14}M$, $5 \times 10^{-15}M$, y $10^{-15}M$.

Además, los polipéptidos de la presente invención pueden ser útiles para inhibir la angiogénesis de células o tejidos proliferativos, bien solos, o como proteína de fusión, o en combinación con otros polipéptidos directa o indirectamente, tal como se describe en otras partes del presente documento. En una realización más preferida, dicho efecto anti-angiogénesis puede lograrse indirectamente, por ejemplo, mediante la inhibición de células hematopoyéticas específicas de tumor, tales como macrófagos asociados a tumor (véase Joseph IB, et al., J Natl Cancer Inst, 90(21):1648-53 (1998)). Los anticuerpos dirigidos a polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención también pueden dar como resultado la inhibición de la angiogénesis directamente o indirectamente (véase Witte L, et al., Cancer Metastasis Rev. 17(2):155-61 (1998)).

Los polipéptidos, incluyendo fusiones de proteínas, de la presente invención, o fragmentos de los mismos pueden ser útiles para inhibir a células o tejidos proliferativos mediante la inducción de la apoptosis. Dichos polipéptidos pueden actuar bien directamente, o indirectamente para inducir la apoptosis de células y tejidos proliferativos, por ejemplo, en la activación de un receptor de dominio de muerte, tal como receptor 1 de factor de necrosis tumoral (TNF), CD95 (Fas/APO-1), proteína mediada por apoptosis relacionada con receptor de TNF (TRAMP) y receptor 1 y 2 de ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) (véase Schulze-Osthoff K, et al., Eur J Biochem 254(3):439-59 (1998)). Además, en otra realización preferida de la presente invención, dichos polipéptidos pueden inducir la apoptosis mediante otros mecanismos, tales como la activación de otras proteínas que activarán la apoptosis, o mediante la estimulación de la expresión de dichas proteínas, bien solas o en combinación con fármacos o adyuvantes de molécula pequeña, tales como apoptonina, galectinas, tioredoxinas, proteínas antiinflamatorias (véase, por ejemplo, Mutat. Res. 400(1-2):447-55 (1998), Med Hypotheses 50(5):423-33 (1998), Chem. Biol. Interact. Apr 24; 111-112:23-34 (1998), J Mol Med. 76(6):402-12 (1998), Int. J. Tissue React. 20(1):3-15 (1998)).

Los polipéptidos, incluyendo fusiones de proteínas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención son útiles para inhibir la metástasis de células o tejidos metastásicos. La inhibición puede suceder como resultado directo de administrar polipéptidos, o anticuerpos dirigidos a dichos polipéptidos tal como se describe en otras partes del presente documento, o indirectamente, tal como activando la expresión de proteínas que se sabe que inhiben la metástasis, por ejemplo, alfa 4 integrinas, (Véase, por ejemplo, Curr Top Microbiol Immunol 1998; 231:125-41). Dichos efectos terapéuticos de la presente invención pueden lograrse solos, o en combinación con fármacos o adyuvantes de molécula pequeña.

En el presente documento se describe además un método para administrar composiciones que contienen los polipéptidos de la invención (por ejemplo, composiciones que contienen polipéptidos o anticuerpos de polipéptidos asociados con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas, o profármacos) a células diana que expresan el polipéptido de la presente invención. Los polipéptidos o anticuerpos de polipéptidos de la invención pueden asociarse con polipéptidos heterólogos, ácidos nucleicos heterólogos, toxinas, o profármacos mediante interacciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes.

Los polipéptidos, fusiones de proteínas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención son útiles para potenciar la inmunogenicidad y/o antigenicidad de las células o tejidos proliferativos, bien directamente, tal como sucedería si los polipéptidos de la presente invención "vacunasen" la respuesta inmune para que responda a antígenos e inmunógenos proliferativos, o indirectamente, tal como activando la expresión de proteínas que se sabe que potencian la respuesta inmunitaria (por ejemplo, quimiocinas), para dichos antígenos e inmunógenos.

Trastornos cardiovasculares

Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares, incluyendo enfermedad de las arterias periféricas, tal como isquemia en las extremidades.

Las enfermedades, trastornos, y/o afecciones cardiovasculares incluyen anomalías cardiovasculares, tales como fístula arterio-arterial, fístula arteriovenosa, malformaciones arteriovenosas cerebrales, defectos cardíacos congénitos, atresia pulmonar, y síndrome de Scimitar. Los defectos cardíacos congénitos incluyen coartación aórtica, corazón triatriado, anomalías de los vasos coronarios, corazón con ventrículos entrecruzados, dextrocardia, ductus arterioso permeable, anomalía de Ebstein, complejo de Eisenmenger, síndrome del corazón izquierdo hipoplásico, levocardia, tetralogía de Fallot, trasposición de los grandes vasos, ventrículo derecho de doble salida, atresia tricúspide, tronco arterioso persistente, y defectos septales del corazón, tal como defecto septal aortopulmonar, defectos de la almohadilla endocárdica, síndrome de Lutembacher, trilogía de Fallot, defectos septales ventriculares cardíacos.

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares también incluyen enfermedades cardíacas, tales como arritmias, enfermedad coronaria carinoide, alto gasto cardíaco, bajo gasto cardíaco, tamponamiento cardíaco, endocarditis (incluyendo bacteriana), aneurisma coronario, paro cardíaco, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía congestiva, disnea paroxística, edema cardíaco, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatía congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia ventricular derecha, rotura cardíaca post-infarto, rotura del septo ventricular, enfermedades de las válvulas cardíacas, enfermedades miocárdicas, isquemia miocárdica, efusión pericárdica, pericarditis (incluyendo constrictiva y tuberculosa), neumopericardio, síndrome postpericardiotomía, enfermedad cardíaca pulmonar, enfermedad cardíaca reumática, disfunción ventricular, hiperemia, complicaciones cardiovasculares del embarazo, síndrome de Scimitar, sífilis cardiovascular y tuberculosis cardiovascular.

Las arritmias incluyen arritmia sinusal, fibrilación auricular, aleteo auricular, bradicardia, extrasístole, síndrome de Adams-Stokes, bloqueo de rama, bloqueo sinoauricular, síndrome del QT largo, parasístole, síndrome de Lown-Ganong-Levine, síndrome de pre-excitación de tipo Mahaim, síndrome de Wolff-Parkinson-White, síndrome del seno enfermo, taquicardias y fibrilación ventricular. Las taquicardias incluyen taquicardia paroxística, taquicardia supraventricular, ritmo idioventricular acelerado, taquicardia intranodal auriculoventricular, taquicardia auricular ectópica, taquicardia ectópica de la unión, taquicardia por reentrada nodal sinusal, taquicardia sinusal, Torsades de

Pointes, y taquicardia ventricular.

5 La enfermedad de las válvulas cardíacas incluye insuficiencia de la válvula aórtica, estenosis de la válvula aórtica, murmullos cardíacos, prolapso de la válvula aórtica, prolapso de la válvula mitral, prolapso de la válvula tricúspide, insuficiencia de la válvula mitral, estenosis de la válvula mitral, atresia pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, estenosis de la válvula pulmonar, atresia tricúspide, insuficiencia de la válvula tricúspide, y estenosis de la válvula tricúspide.

10 Las enfermedades miocárdicas incluyen cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía congestiva, cardiomiopatía hipertrófica, estenosis subvalvular aórtica, estenosis subvalvular pulmonar, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía de Chagas, fibroelastosis endocárdica, fibrosis endomiocárdica, síndrome de Kearns, lesión por reperfusión miocárdica y miocarditis.

15 Las isquemias miocárdicas incluyen enfermedades coronarias, tales como angina de pecho, aneurisma coronario, arterioesclerosis coronaria, trombosis coronaria, vasoespasmo coronario, infarto de miocardio y aturdimiento miocárdico.

20 Las enfermedades cardiovasculares también incluyen enfermedades vasculares, tales como aneurismas, angiodisplasia, angiomas, angiomas bacilar, enfermedad de Hippel-Lindau, síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, síndrome de Sturge-Weber, edema angioneurótico, enfermedades aórticas, arteritis de Takayasu, aortitis, síndrome de Leriche, enfermedades oclusivas arteriales, arteritis, enarteritis, poliarteritis nodosa, enfermedades , trastornos y/o afecciones cerebrovasculares, angiopatías diabéticas, retinopatía diabética, embolismos, trombosis, eritromegalia, hemorroides, enfermedad veno-oclusiva hepática, hipertensión, hipotensión, isquemia, enfermedades vasculares periféricas, flebitis, enfermedad veno-oclusiva pulmonar, enfermedad de Raynaud, síndrome de CREST, oclusión de la vena retinal, síndrome de Scimitar, síndrome de la vena cava superior, telangiectasia, ataxia-telangectasia, telangectasia hemorrágica hereditaria, varicocele, venas varicosas, úlcera varicosa, vasculitis, e insuficiencia venosa.

30 Los aneurismas incluyen aneurismas por disección, falsos aneurismas, aneurismas infectados, aneurismas rotos, aneurismas aórticos, aneurismas cerebrales, aneurismas coronarios, aneurismas cardíacos, y aneurismas ilíacos.

35 Las enfermedades oclusivas arteriales incluyen arterioesclerosis, claudicación intermitente, estenosis carotídea, displasias fibromusculares, oclusión vascular mesentérica, enfermedad de Moyamoya, obstrucción de la arteria renal, oclusión de la arteria retiniana, y tromboangitis obliterante.

40 Las enfermedades, trastornos y/o afecciones cerebrovasculares incluyen enfermedades de la arteria carótida, angiopatía amiloide cerebral, aneurisma cerebral, anoxia cerebral, arteriosclerosis cerebral, malformación arteriovenosa cerebral, enfermedades de la arteria cerebral, embolismo y trombosis cerebral, trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno, síndrome de Wallenberg, hemorragia cerebral, hematoma epidural, hematoma subdural, hemorragia subaracnoidea, infarto cerebral, isquemia cerebral (incluyendo transitoria), síndrome del robo de la subclavia, leucomalacia periventricular, cefalea vascular, cefalea en racimos, migraña, e insuficiencia vertebrobasilar.

45 Los embolismos incluyen embolismos aéreos, embolismos de fluido amniótico, embolismos por colesterol, síndrome de los dedos de los pies azules, embolismos por grasas, embolismos pulmonares, y tromboembolismos. Las trombosis incluyen trombosis coronaria, trombosis de la vena hepática, oclusión de la vena retinal, trombosis de la arteria carótida, trombosis del seno, síndrome de Wallenberg, y tromboflebitis.

50 La isquemia incluye isquemia cerebral, colitis isquémica, síndromes compartimentales, síndrome del compartimento anterior, isquemia miocárdica, lesiones por reperfusión, e isquemia periférica de las extremidades. Las vasculitis incluyen aortitis, arteritis, síndrome de Behcet, síndrome de Churg-Strauss, síndrome del nódulo linfático mucocutáneo, tromboangitis obliterante, vasculitis por hipersensibilidad, púrpura de Schoenlein-Henoch, vasculitis cutánea alérgica y granulomatosis de Wegener.

55 Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, son especialmente eficaces para el tratamiento de la isquemia de las extremidades y la enfermedad coronaria crítica.

60 Los polipéptidos pueden administrarse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, inyección directa con aguja en el sitio de administración, inyección intravenosa, administración tópica, infusión por catéter, inyectores biolísticos, aceleradores de partículas, depósitos de esponja de espuma de gel, otros materiales de depósito comercialmente disponibles, bombas osmóticas, formulaciones farmacéuticas sólidas orales o en supositorio, aplicaciones por decantación o tópicas durante la cirugía, administración de aerosol. Dichos métodos son conocidos en la técnica. Los polipéptidos de la invención pueden administrarse como parte de una terapia, como se describe en más detalle más adelante. Los métodos para administrar polinucleótidos de la invención se describen en más detalle en el presente documento.

Enfermedades neurológicas

Las enfermedades, trastornos y/o afecciones del sistema nervioso que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse con las composiciones de la invención (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos, y/o agonistas o antagonistas), incluyen, pero sin limitación, lesiones del sistema nervioso, y enfermedades, trastornos, y/o afecciones que dan como resultado una desconexión de axones, una disminución o degradación de neuronas o desmielinización. Las lesiones del sistema nervioso que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse en un paciente (incluyendo pacientes humanos y de mamífero no humano) de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, las siguientes lesiones del sistema nervioso central (incluyendo la médula espinal y el cerebro) o periférico: (1) lesiones isquémicas, en las que una carencia de oxígeno en una porción del sistema nervioso da como resultado una lesión o la muerte neuronal, incluyendo infarto o isquemia cerebral, o infarto o isquemia de la médula espinal; (2) lesiones traumáticas, incluyendo lesiones causadas por una lesión física o asociadas con la cirugía, por ejemplo, lesiones que seccionan una porción del sistema nervioso, o lesiones por compresión; (3) lesiones neoplásicas, en las que una porción del sistema nervioso se destruye o lesiona por el tejido neoplásico que es bien una neoplasia asociada al sistema nervioso o una neoplasia derivada de tejido no nervioso; (4) lesiones infecciosas, en las que una porción del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de una infección, por ejemplo, por un absceso o asociadas con la infección por virus de la inmunodeficiencia humana, *Herpes Zoster*, o virus del herpes simple o con la enfermedad de Lyme, tuberculosis, sífilis; (5) lesiones degenerativas, en las que una porción del sistema nervioso se destruye o lesiona como resultado de un proceso degenerativo, incluyendo, pero sin limitación, la degeneración asociada con la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, corea de Huntington, o esclerosis lateral amiotrófica (ELA); (6) lesiones asociadas con enfermedades, trastornos, y/o afecciones nutricionales, en las que una porción del sistema nervioso se destruye o lesiona por un trastorno nutricional o un trastorno metabólico, incluyendo, pero sin limitación, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad de Wernicke, ambliopía por tabaco-alcohol, enfermedad de Marchiafava-Bignami (degeneración primaria del cuerpo calloso), y degeneración cerebelar alcohólica; (7) lesiones neurológicas asociadas con enfermedades sistémicas, incluyendo, pero sin limitación, diabetes (neuropatía diabética, parálisis de Bell), lupus sistémico eritematoso, carcinoma, o sarcoidosis; (8) lesiones causadas por sustancias tóxicas, incluyendo alcohol, plomo, o neurotoxinas particulares; y (9) lesiones desmielinizadas en las que una porción del sistema nervioso central se destruye o lesiona por una enfermedad desmielinizante, incluyendo, pero sin limitación, esclerosis múltiple, mielopatía asociada con el virus de la inmunodeficiencia humana, mielopatías transversales de varias etiologías, leucoencefalopatía multifocal progresiva, y mielínolisis central pontina.

En una realización preferida, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento se usan para proteger a las células neuronales de los efectos perjudiciales de la hipoxia cerebral. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la invención se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar la lesión celular neural asociada con la hipoxia cerebral. En un aspecto de esta realización, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar la lesión celular neural asociada con la isquemia cerebral. En otro aspecto de esta realización, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar la lesión celular neural asociada con el infarto cerebral. En otro aspecto de esta realización, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar o prevenir la lesión celular neural asociada con el ictus. En un aspecto adicional de esta realización, los polipéptidos y polinucleótidos de la invención, o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar la lesión celular neural asociada con un ataque cardíaco.

Las composiciones de la invención que son útiles para tratar o prevenir un trastorno del sistema nervioso central pueden seleccionarse ensayando la actividad biológica para promover la supervivencia o diferenciación de las neuronas. Por ejemplo, pero no como limitación, las composiciones de la invención que provocan cualquiera de los siguientes efectos pueden ser útiles de acuerdo con la invención: (1) tiempo de supervivencia aumentado de neuronas en cultivo; (2) brotación aumentada de neuronas en cultivo o *in vivo*; (3) producción aumentada de una molécula asociada con una neurona en cultivo o *in vivo*, por ejemplo, acetiltransferasa de colina o acetilcolinesterasa con respecto a las neuronas motoras; o (4) síntomas disminuidos de disfunción neuronal *in vivo*. Dichos efectos pueden medirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En limitaciones preferidas no limitantes, la supervivencia aumentada de neuronas puede medirse de manera rutinaria usando un método expuesto en el presente documento o conocido de otro modo en la técnica, tales como, por ejemplo, el método expuesto en Arakawa et al., (J. Neurosci. 10:3507-3515 (1990)); la brotación aumentada de neuronas puede detectarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los métodos expuestos en Pestronk et al., (Exp. Neurol. 70:65-82 (1980)) o Brown et al. (Ann. Rev. Neurosci. 4:17-42 (1981)); la producción aumentada de moléculas asociadas a neuronas puede medirse mediante bioensayo, ensayo enzimático, unión de anticuerpos, ensayo de transferencia de Northern, etc., usando técnicas conocidas en la materia y dependiendo de la molécula que se va a medir; y la disfunción de neuronas motoras puede medirse evaluando la manifestación física de un trastorno de las neuronas motoras, por ejemplo, debilidad, velocidad de conducción de las neuronas motoras, o incapacidad funcional.

En realizaciones específicas, las enfermedades, trastornos, y/o afecciones de las neuronas motoras que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades, trastornos, y/o afecciones, tales como infarto, infección, exposición a toxinas, trauma, daño quirúrgico, enfermedades

degenerativas o neoplasias que puedan afectar a las neuronas motoras, así como otros componentes del sistema nervioso, así como enfermedades, trastornos, y/o afecciones que afectan selectivamente a las neuronas, tales como esclerosis lateral amiotrófica, e incluyendo, pero sin limitación, atrofia muscular espinal progresiva, parálisis bulbar progresiva, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular infantil y juvenil, parálisis bulbar progresiva de la infancia (síndrome de Fazio-Londe), poliometilitis y síndrome post-polio, y neuropatía motosensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth).

Enfermedades infecciosas

Un polipéptido o polinucleótido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar agentes infecciosos. Por ejemplo, al aumentar la respuesta inmunitaria, particularmente al aumentar la proliferación y diferenciación de linfocitos B y/o T, pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse las enfermedades infecciosas. La respuesta inmunitaria puede aumentarse bien potenciando una respuesta inmune existente, o iniciando una nueva respuesta inmune. Como alternativa, un polipéptido o polinucleótido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede también inhibir directamente al agente infeccioso, sin provocar necesariamente una respuesta inmunitaria.

Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o síntomas que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de virus incluyen, pero no están limitados a los siguientes virus y familias de virus de ADN y ARN: *arbovirus*, *adenoviridae*, *arenaviridae*, *arterivirus*, *birnaviridae*, *bunyaviridae*, *caliciviridae*, *circoviridae*, *coronaviridae*, dengue, EBV, HIV, *flaviviridae*, *hepadnaviridae* (Hepatitis), *herpesviridae* (tales como, citomegalovirus, *Herpes Simplex*, *Herpes Zoster*, monomegavirus (por ejemplo, *paramyxoviridae*, *morbillivirus*, *rhabdoviridae*), *orthomyxoviridae* (por ejemplo, gripe A, gripe B, y parainfluenza), *Papilloma virus*, *Papovaviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae* (tales como viruela or vaccinia), *reoviridae* (por ejemplo, Rotavirus), *retroviridae* (HTLV-I, HTLV-II, lentivirus), y *togaviridae* (por ejemplo, rubivirus). los virus que se encuentran dentro de estas familias pueden causar diversas enfermedades o síntomas incluyendo, pero sin limitación: artritis, bronquiolitis, virus respiratorio sincitial, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de la fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, activa crónica, delta), encefalitis B japonesa, junin, chikungunya, fiebre del valle del Rift, fiebre amarilla, meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, el resfriado común, polio, leucemia, rubeola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades cutáneas (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, verrugas), y viremia. Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, polinucleótidos, los polipéptidos de la invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar: la meningitis, dengue, EBV, y/o la hepatitis (por ejemplo, hepatitis B). En una realización específica adicional, los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, se usan para tratar a los pacientes que no responden a una o más vacunas para la hepatitis comercialmente disponibles. En una realización específica adicional, los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar el SIDA.

De manera similar, los agentes bacterianos o fúngicos que pueden causar enfermedad o síntomas y que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitación, incluyen, pero sin limitación, las siguientes bacterias y familias bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas y hongos: *Actinomycetales* (por ejemplo, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), *Cryptococcus neoformans*, aspergilosis, *Bacillaceae* (por ejemplo, *Anthrax*, *Clostridium*), *Bacteroidaceae*, blastomycosis, *Bordetella*, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), brucelosis, candidiasis, *Campylobacter*, coccidioidomicosis, criptococosis, dermatococosis, *E. coli* (e.g., *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, y *Salmonella paratyphi*), *Serratia*, *Yersinia*), *Erysipelothrix*, *Helicobacter*, legionelosis, leptospirosis, *Listeria*, *Mycoplasmatales*, *Mycobacterium leprae*, *Vibrio cholerae*, *Neisseriaceae* (por ejemplo, *Acinetobacter*, gonorrea, meningococemia), *Meisseria meningitidis*, infecciones por *Pasteurellaceae* (por ejemplo, *Actinobacillus*, *Heamophilus* (por ejemplo, *Heamophilus influenza* de tipo B), *Pasteurella*), *Pseudomonas*, *Rickettsiaceae*, *Chlamydiaceae*, sífilis, *Shigella spp.*, estafilocócicas, meningocócicas, neumocócicas y estreptocócicas (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* de grupo B). Estas familias bacterianas o fúngicas pueden causar las siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitación: bacteriemia, endocarditis infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveitis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, infecciones relacionadas con el SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones del tracto respiratorio, tales como tos ferina o empiema, septicemia, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, intoxicación alimentaria, tifus, neumonía, gonorrea, meningitis (por ejemplo, meningitis de tipos A y B), clamidia, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulismo, gangrena, tétano, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades cutáneas (por ejemplo, celulitis, dermatococosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas. Los polinucleótidos o polipéptidos de

la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar: tétanos, difteria, botulismo, y/o meningitis de tipo B.

Además, los agentes parasíticos que causan enfermedad o síntomas que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse mediante un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las siguientes familias o clases: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, durina, ectoparasítica, giardiasis, helmintiasis, leishmaniasis, teileriasis, toxoplasmosis, tripanosomiasis, y tricomonas y esporozoos (por ejemplo, *Plasmodium virax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*). Estos parásitos pueden causar diversas enfermedades o síntomas incluyendo, pero sin limitación: sarna, trombiculiasis, infecciones oculares, enfermedad intestinal (por ejemplo, disentería, giardiasis), enfermedad hepática, enfermedad pulmonar, infecciones oportunistas (por ejemplo, relacionadas con el SIDA), malaria, complicaciones del embarazo y toxoplasmosis. Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento, pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, los polinucleótidos o polipéptidos de la invención, o los agonistas o antagonistas, tal como se describen en el presente documento se usan para tratar, prevenir, y/o diagnosticar la malaria.

Preferentemente, el tratamiento o prevención usando un polipéptido o polinucleótido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento podría ser mediante la administración de una cantidad eficaz de un polipéptido al paciente, o retirando células del paciente, suministrando a las células un polinucleótido de la presente invención, y devolviendo las células modificadas por ingeniería genética al paciente (terapia *ex vivo*). Además, el polipéptido o polinucleótido de la presente invención puede usarse como antígeno en una vacuna para provocar una respuesta inmunitaria contra una enfermedad infecciosa.

Regeneración

Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede usarse para diferenciar, proliferar y atraer células, dando lugar a la regeneración de tejidos. (Véase, Science 276:59-87 (1997)). La regeneración de tejidos puede usarse para reparar, reemplazar o proteger al tejido dañado por daños congénitos, traumatismos (heridas, quemaduras, incisiones o úlceras), la edad, enfermedad (por ejemplo, osteoporosis, artrosis, enfermedad periodontal, insuficiencia hepática), cirugía, incluyendo cirugía plástica cosmética, fibrosis, lesión por reperusión, o daño sistémico por citocinas.

Los tejidos que pueden regenerarse usando la presente invención incluyen tejidos de órganos (por ejemplo, páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco), vasculatura (incluyendo vascular y linfática), nervioso, hematopoyético y esquelético (hueso, cartílago, tendón, y ligamento). Preferentemente, la regeneración sucede sin cicatrización o con cicatrización disminuida. La regeneración también puede incluir angiogénesis.

Además, un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede aumentar la regeneración de tejidos difíciles de curar. Por ejemplo, la regeneración aumentada de tendones/ligamentos acelerará el tiempo de recuperación después del daño. Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento también podría usarse profilácticamente en un esfuerzo para evitar daños. Las enfermedades específicas que podrían tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse incluyen tendinitis, síndrome del túnel carpiano, y otros defectos de los ligamentos o tendones. Un ejemplo adicional de regeneración de tejidos de heridas que no sanan incluyen las úlceras por presión, las úlceras asociadas con la insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas.

De manera similar, el tejido nervioso y cerebral también podría regenerarse usando un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento para proliferar y diferenciar células nerviosas. Las enfermedades que pueden tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse usando este método incluyen enfermedades del sistema nervioso central y periférico, neuropatías, o enfermedades, trastornos y/o afecciones mecánicas y traumáticas (por ejemplo, trastornos de la médula espinal, trauma encefálico, enfermedad cerebrovascular, e ictus). Específicamente, las enfermedades asociadas con lesiones de los nervios periféricos, neuropatía periférica (por ejemplo, como resultado de la quimioterapia u otras terapias médicas), neuropatías localizadas, y enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y síndrome de Shy-Drager), podrían tratarse, prevenirse, y/o diagnosticarse usando el polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o el agonista o antagonista descrito en el presente documento.

Actividad de unión

Un polipéptido de la presente invención puede usarse para explorar moléculas que se unen al polipéptido o moléculas a las que se une el polipéptido. La unión del polipéptido y la molécula puede activar (agonismo), aumentar, inhibir

(antagonismo), o disminuir la actividad del polipéptido o de la molécula unida. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (por ejemplo, receptores), o moléculas pequeñas.

Preferentemente, la molécula está estrechamente relacionada con el ligando natural del polipéptido, por ejemplo, un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, un mimético estructural o funcional. (Véase, Coligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2): Capítulo 5 (1991).) De manera similar, la molécula puede estar estrechamente relacionada con el receptor natural al que se une el polipéptido o al menos, un fragmento del receptor capaz de unirse al polipéptido (por ejemplo, el sitio activo). En cualquier caso, la molécula puede diseñarse racionalmente usando técnicas conocidas.

Preferentemente, la exploración de estas moléculas implica producir células adecuadas que expresan el polipéptido, bien como proteína secretada o sobre la membrana celular. Las células preferidas incluyen células de mamíferos, levaduras, *Drosophila*, o *E. coli*. Las células que expresan el polipéptido (o la membrana celular que contiene el polipéptido expresado) se ponen en contacto con un compuesto de ensayo que contiene potencialmente la molécula para observar la unión, estimulación, o inhibición de la actividad del polipéptido o de la molécula.

El ensayo puede simplemente probar la unión de un compuesto candidato al polipéptido, en el que la unión se detecta por medio de un marcador, o en un ensayo que implica la competición con un competidor marcado. Además, el ensayo puede probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la unión al polipéptido.

Como alternativa, el ensayo puede llevarse a cabo usando preparaciones sin células, polipéptido/molécula fijada a un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. El ensayo también puede comprender únicamente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido, medir la actividad o unión del polipéptido/molécula, y comparar la actividad o unión del polipéptido/molécula con un estándar.

Preferentemente, un ensayo ELISA puede medir el nivel de polipéptido o actividad en una muestra (por ejemplo, muestra biológica) usando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel de polipéptido o la actividad bien mediante unión, directa o indirectamente, al polipéptido o mediante competición con el polipéptido por un sustrato.

Adicionalmente, el receptor al que se une un polipéptido de la invención puede identificarse mediante numerosos métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, paneo de ligando y clasificación FACS® (Coligan, et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2), Capítulo 5, (1991)). Por ejemplo, se emplea clonación de expresión en la que el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula que responde a los polipéptidos, por ejemplo, células NIH3T3 que se sabe que contienen múltiples receptores para las proteínas de la familia de FGF, y células SC-3, y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se dividen en grupos y se usan para transfectar células COS u otras células que no responden a los polipéptidos. Las células transfectadas que se crecen en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido de la presente invención, después de que se hayan marcado. Los polipéptidos pueden marcarse mediante diversos medios, incluyendo yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína cinasa específica de sitio.

Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso de subagrupación y re-exploración, produciendo eventualmente un solo clon que codifica el receptor putativo.

Como estrategia alternativa para la identificación de receptores, los polipéptidos marcados pueden unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana celular o extractos que expresan la molécula de receptor. El material reticulado se resuelve mediante análisis PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene los receptores de los polipéptidos puede cortarse, resolverse en fragmentos peptídicos, y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación podría usarse para diseñar un conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para explorar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican a los receptores putativos.

Además, las técnicas de reordenamiento génico, de reordenamiento de motivos, de reordenamiento de exones, y/o de reordenamiento de codones (citadas colectivamente como "reordenamiento de ADN") pueden emplearse para modular las actividades de los polipéptidos de la invención, generando de este modo de una manera eficaz agonistas y antagonistas de los polipéptidos de la invención. Véanse de manera general, las Patentes de los Estados Unidos con números 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252, y 5.837.458, y Patten, P. A., et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33 (1997). Harayama, S. *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82 (1998); Hansson, L. O., et al., *J. Mol. Biol.* 287:265-76 (1999), y Lorenzo, M. M. y Blasco, R. *Biotechniques* 24(2):308-13 (1998). La alteración de polinucleótidos y de los polipéptidos correspondientes de la invención puede lograrse mediante reordenamiento de ADN. El reordenamiento de ADN implica el montaje de dos o más segmentos de ADN en una secuencia polinucleotídica deseada de la molécula de la invención mediante recombinación de homólogos o de sitio específico. Los polinucleótidos y los polipéptidos correspondientes de la invención también pueden alterarse sometiéndose a mutagénesis al azar mediante PCR propensa a errores, inserción al azar de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Además, uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de los polipéptidos de la

invención pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas. En realizaciones preferidas, las moléculas heterólogas son miembros de una familia. En realizaciones preferidas adicionales, la molécula heteróloga es un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento insulínico (IGF-I), factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF-beta, proteína morfogenética de hueso (BMP)-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, activinas A y B, decapentaplégico (dpp), 60 A, OP-2, dorsalina, factores de diferenciación del crecimiento (GDF), nodal, MIS, inhibina-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta5, y factor neurotrófico derivado glial (GDNF).

Otros fragmentos preferidos son fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de la invención. Los fragmentos biológicamente activos son aquellos que muestran una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad del polipéptido. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad mejorada deseada, o una actividad no deseada disminuida.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para explorar compuestos para identificar aquellos que modulan la acción del polipéptido de la presente invención. Un ejemplo de dicho ensayo comprende combinar una célula de fibroblasto de mamífero, el polipéptido de la presente invención, el compuesto que se va a explorar y ³[H] timidina en condiciones de cultivo celular donde el fibroblasto podría proliferar normalmente. Puede llevarse a cabo un ensayo de control en ausencia del compuesto que se va a explorar y se compara con la cantidad de proliferación de fibroblastos en presencia del compuesto para determinar si el compuesto estimula la proliferación determinando la captación de ³[H] timidina en cada caso. La cantidad de proliferación celular de fibroblastos se mide mediante cromatografía de centelleo líquida que mide la incorporación de ³[H] timidina. Los compuestos tanto agonistas como antagonistas pueden identificarse mediante este procedimiento.

En otro método, se incuba una célula de mamífero o una preparación de membrana que expresa un receptor para un polipéptido de la presente invención con un polipéptido marcado de la presente invención en presencia del compuesto. La capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción podría entonces medirse. Como alternativa, se mide la respuesta de un segundo sistema de mensajero después de la interacción de un compuesto que se va a explorar y el receptor y se mide la capacidad del compuesto para unirse al receptor y provocar una segunda respuesta de mensajero para determinar si el compuesto es un agonista o antagonista potencial. Dichos sistemas de segundo mensajero incluyen, pero sin limitación, guanilato ciclase de AMPc, canales de iones o hidrólisis de fosfoinositida.

Todos estos ensayos anteriores pueden usarse como marcadores diagnósticos o pronósticos. Las moléculas descubiertas usando estos ensayos pueden usarse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar enfermedades o para provocar un resultado particular en un paciente (por ejemplo, crecimiento de vasos sanguíneos) activando o inhibiendo el polipéptido/molécula. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de los polipéptidos de la invención a partir de células o tejidos adecuadamente manipulados. Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para identificar compuestos que se unen a los polipéptidos de la invención que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto de unión candidato con el polipéptido; y (b) determinar si ha sucedido la unión. Además, en el presente documento se describe un método para identificar agonistas/antagonistas que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato con el polipéptido, (b) ensayar una actividad biológica, y (c) determinar si se ha alterado una actividad biológica del polipéptido.

Asimismo, podrían identificarse moléculas que se unen a polipéptidos de la invención de manera experimental usando las regiones de beta-lámina contenidas en la secuencia polipeptídica de la proteína. Por consiguiente, en el presente documento se describen los polinucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o como alternativa consisten en, la secuencia aminocídica de cada región de beta-lámina en una secuencia polipeptídica divulgada. Adicionalmente, en el presente documento se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa consisten en, la secuencia aminoacídica de cada una de las regiones de beta lámina en una de las secuencias polipeptídicas de la invención. Adicionalmente, en el presente documento se describen polipéptidos que comprenden, o como alternativa consisten en, cualquier combinación o todas las regiones de beta lámina en una de las secuencias polipeptídicas de la invención.

Exploración de fármacos

Además se contempla el uso de los polipéptidos de la presente invención, o de los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, para explorar moléculas que modifican las actividades de los polipéptidos de la presente invención. Dicho método podría incluir poner en contacto el polipéptido de la presente invención con un compuesto seleccionado que se sospecha que tiene actividad antagonista o agonista, y ensayar la actividad de estos polipéptidos después de la unión.

Esta invención es particularmente útil para explorar compuestos terapéuticos usando los polipéptidos de la presente invención, o fragmentos de unión de los mismos, en cualquiera de diversas técnicas de exploración de fármacos. El polipéptido o fragmento empleado en dicho ensayo puede fijarse a un soporte sólido, expresarse sobre una superficie celular, estar libre en solución, o localizarse intracelularmente. Un método de exploración de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman de manera estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento. Los fármacos se exploran contra dichas células transformadas en ensayos

de unión competitiva. Se puede medir, por ejemplo, la formulación de complejos entre el agente que se está ensayando y un polipéptido de la presente invención.

Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para explorar agentes que afectan a actividades mediadas por los polipéptidos de la presente invención. Estos métodos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido de la presente invención o un fragmento del mismo y ensayar la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido o un fragmento del mismo, mediante métodos bien conocidos en la técnica. En dicho ensayo de unión competitiva, los agentes que se van a explorar están normalmente marcados. Tras la incubación, el agente libre se separa del presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o no complejo es una medida de la capacidad de un agente particular para unirse a los polipéptidos de la presente invención.

Otra técnica para exploración de fármacos proporciona exploración de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada para los polipéptidos de la presente invención, y se describe en gran detalle en la Solicitud de Patente Europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Dicho brevemente, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, tales como puntas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con polipéptidos de la presente invención y se lavan. Los polipéptidos unidos después se detectan mediante métodos bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos purificados se recubren directamente sobre placas para su uso en las técnicas de exploración de fármacos anteriormente mencionadas. Además, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

También se contempla en el presente documento el uso de ensayos competitivos de exploración de fármacos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a polipéptidos de la invención compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión a los polipéptidos o fragmentos de los mismos. De este modo, se usan los anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más epítomos antigénicos con un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c humanos de la presente invención, o los fragmentos u oligopéptidos inmunogénicos de los mismos pueden usarse para explorar fármacos o compuestos terapéuticos en diversas técnicas de exploración de fármacos. El fragmento empleado en dicho ensayo de exploración puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, portado sobre una superficie celular, o localizarse intracelularmente. Puede medirse la reducción o la abolición de la actividad de formación de compuestos de unión entre la proteína de canal de iones y el agente que se está ensayando. Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para explorar o ensayar diversos compuestos para su afinidad de unión específica con un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c de esta invención, o un fragmento peptídico unible descrito en el presente documento, que comprende proporcionar diversos compuestos, combinar el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, o un fragmento peptídico unible, con cada uno de diversos compuestos durante un tiempo suficiente como para permitir la unión en condiciones adecuadas y detectar la unión del polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c a cada uno de la diversidad de compuestos de ensayo, identificando de este modo los compuestos que se unen específicamente al polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c.

Los métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de los nuevos polipéptidos y/o péptidos de PCSK9b o PCSK9c se describen en el presente documento y comprenden combinar un compuesto o fármaco potencial o candidato modulador de la actividad biológica de calpaína con un polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de PCSK9b o PCSK9c tal como se expone en SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, y medir un efecto del compuesto o fármaco candidato modulador sobre la actividad biológica del polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c. Dichos efectos medibles incluyen, por ejemplo, la interacción de unión física; la capacidad para escindir un sustrato de calpaína adecuado; efectos en una línea celular nativa y clonada que expresa PCSK9b o PCSK9c; y efectos de moduladores u otras medidas fisiológicas mediadas por calpaína.

Otro método para identificar compuestos que modulan la actividad biológica de los nuevos polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c de la presente invención comprende combinar un compuesto o fármaco potencial o candidato a modulador de una actividad biológica de calpaína con una línea celular hospedadora que expresa el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y medir un efecto del compuesto o fármaco candidato a modulador en la actividad biológica del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c. La célula hospedadora también puede ser capaz de inducirse para expresar el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, por ejemplo, mediante expresión inducible. También pueden medirse los efectos fisiológicos de un candidato a modulador dado en el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c. Por lo tanto, los ensayos celulares para moduladores de calpaína particulares pueden ser bien la medición directa o cuantificación de la actividad biológica física del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, o pueden ser la medida o cuantificación de un efecto fisiológico. Dichos métodos emplean preferentemente un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c tal como se describen en el presente documento, o un polipéptido recombinante de PCSK9b o PCSK9c sobreexpresado en células hospedadoras adecuadas que contienen un vector de expresión tal como se describe en el presente documento, en el que el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c se expresa, sobreexpresa, o sufre expresión regulada positivamente.

Además, en el presente documento se describe un método para explorar un compuesto que es capaz de modular la actividad biológica de un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, comprendiendo el método proporcionar una célula

hospedadora que contiene un vector de expresión que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, o una porción peptídica funcional de los mismos (por ejemplo, SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4); determinar la actividad biológica del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c expresado en ausencia de un compuesto modulador; poner en contacto la célula con el compuesto modulador y determinar la actividad biológica del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c expresado en presencia del compuesto modulador. En dicho método, una diferencia entre la actividad del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c en presencia del compuesto modulador y en ausencia del compuesto modulador indica un efecto modulador del compuesto.

Esencialmente, cualquier compuesto químico puede emplearse como un modulador o ligando potencial en los ensayos descritos en el presente documento. Los compuestos ensayados como moduladores de calpaína pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o entidad biológica (por ejemplo, proteína, azúcar, ácido nucleico, lípido). Los compuestos de ensayo serán normalmente moléculas químicas y péptidos pequeños. En general, los compuestos usados como moduladores potenciales pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (por ejemplo, basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para explorar grandes bibliotecas de químicos automatizando las etapas de ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente. Los ensayos se ejecutan normalmente en paralelo, por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robotizados. Hay muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza), por ejemplo. Asimismo, pueden sintetizarse compuestos mediante métodos conocidos en la técnica.

Las metodologías de exploración de alto rendimiento están particularmente previstas para la detección de moduladores de los nuevos polinucleótidos y polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c descritos en el presente documento. Dichos métodos de exploración de alto rendimiento implican normalmente proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (por ejemplo, ligandos o compuestos moduladores). Dichas bibliotecas químicas combinatorias o bibliotecas de ligandos se exploran entonces en uno o más ensayos para identificar a aquellos miembros de la biblioteca (por ejemplo, especies o subclases químicas particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden servir como compuestos líder convencionales, o pueden usarse por sí mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados bien mediante síntesis química o bien mediante síntesis biológica, combinando una serie de bloques de construcción químicos (es decir, reactivos, tales como aminoácidos). Como ejemplo, una biblioteca combinatoria lineal, por ejemplo, una biblioteca polipeptídica o peptídica, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos de cada una de las formas posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico o peptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos mediante dicha mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos.

La preparación y exploración de bibliotecas químicas combinatorias se conoce bien por los expertos en la materia pertinente. Las bibliotecas combinatorias incluyen, sin limitación, bibliotecas peptídicas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.010.175; Furka, 1991, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-493; y Houghton et al., 1991, Nature, 354:84-88). También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Los ejemplos no limitantes de químicas de biblioteca de diversidad química incluyen, péptidos (publicación PCT N° WO 91/019735), péptidos codificados (publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros al azar (publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (patente de los Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6909-6913), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc., 114:6568), peptidomiméticos no peptídicos con estructura de glucosa (Hirschmann et al., 1992, J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-9218), síntesis orgánica análoga de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., 1994, J. Amer. Chem. Soc., 116:2661), oligocarbamatos (Cho et al., 1993, Science, 261:1303), y/o peptidil fosfonatos (Campbell et al., 1994, J. Org. Chem., 59:658), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook, todos citados anteriormente), bibliotecas de ácidos peptidonucleicos (Patente de Estados Unidos N° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (por ejemplo, Vaughn et al., 1996, Nature Biotechnology, 14(3):309-314) y el documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (por ejemplo, Liang et al., 1996, Science, 274:1520-1522) y la Patente de Estados Unidos N° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero de 1993, página 33; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.288.514; isoprenoides, la patente de Estados Unidos N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, la patente de Estados Unidos N° 5.549.974; pirrolidinas, las Patentes de los Estados Unidos con números 5.525.735 y 5.519.134, compuestos morfolino, la patente de Estados Unidos N° 5.506.337; y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, hay comercialmente disponible un gran número de bibliotecas combinatorias (por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscú, Rusia; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd., Moscú, Rusia; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD, y similares).

En el presente documento se describen ensayos *in vitro* basados en fase sólida en un formato de alto rendimiento,

donde la célula o tejido que expresa un canal de iones se une a un sustrato de fase sólida. En dichos ensayos de alto rendimiento, es posible explorar hasta varios cientos moduladores o ligandos diferentes en un solo día. En particular, puede usarse cada pocillo de una placa de microtitulación para llevar a cabo un ensayo individual contra un modulador potencial seleccionado o, si van a observarse los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden ensayar un solo modulador. Por lo tanto, una sola placa de microtitulación convencional puede ensayar aproximadamente 96 moduladores. Si se usan placas de 1536 pocillos, una sola placa puede ensayar fácilmente entre aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible ensayar varias placas diferentes al día; por lo tanto, por ejemplo, son posibles ensayos de exploración de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes usando los sistemas integrados descritos.

En el presente documento se describen ensayos de exploración y de detección de moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos) que implican la detección o identificación de moléculas pequeñas que pueden unirse a una proteína dada, es decir, un polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c. Se prefieren particularmente ensayos adecuados para metodologías de exploración de alto rendimiento.

En dichos ensayos de detección, identificación o exploración basados en la unión, no se requiere normalmente un ensayo funcional. Todo lo que se necesita es una proteína diana, preferentemente sustancialmente purificada, y una biblioteca o panel de compuestos (por ejemplo, ligandos, fármacos, moléculas pequeñas) o de entidades biológicas que se van a explorar o ensayar para la unión a la diana proteica. Preferentemente, la mayoría de las moléculas que se unen a la proteína diana modularán la actividad de algún modo, debido a la unión preferencial de mayor afinidad a áreas funcionales o sitios sobre la proteína.

Un ejemplo de dicho ensayo es el ensayo de cambio térmico basado en fluorescencia (3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, PA) y descrito en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.020.141 y 6.036.920 de Pantoliano et al.; véase también, J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8)). El ensayo permite la detección de moléculas pequeñas (por ejemplo, fármacos, ligandos) que se unen a polipéptido de canal iónico expresado y preferentemente purificado basándose en determinaciones de afinidad de unión analizando curvas de desplegamiento térmico de complejos de proteína-fármaco o ligando. Los fármacos o moléculas de unión determinados mediante esta técnica pueden ensayarse además, si se desea, mediante métodos, tales como aquellos descritos en el presente documento, para determinar si las moléculas afectan o modulan la función o actividad de la proteína diana.

Para purificar un polipéptido o péptido de PCSK9b o PCSK9c para medir una unión biológica o una actividad de unión de ligando, la fuente puede ser un lisado de células completas que puede prepararse mediante sucesivos ciclos de congelación-descongelación (por ejemplo, de uno a tres) en presencia de inhibidores de la proteasa estándar. El polipéptido de PCSK9b o PCSK9c puede purificarse parcialmente o totalmente mediante métodos de purificación de proteínas estándar, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando anticuerpos específicos descritos más adelante, o mediante ligandos específicos para un marcador epitópico diseñado en la molécula de polipéptido de PCSK9b o PCSK9c recombinante, también tal como se describe en el presente documento. Entonces puede medirse la actividad de unión tal como se ha descrito.

Se prefieren los compuestos que se identifican de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, y que modulan o regulan la actividad biológica o la fisiología de los polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c de acuerdo con la presente invención. Se contempla que dichos compuestos moduladores puedan emplearse en métodos de tratamiento y terapéuticos para tratar una afección que está mediada por los nuevos polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c administrando a un individuo que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto identificado mediante los métodos descritos en el presente documento.

Además, en el presente documento se describen métodos para tratar a un individuo que necesite dicho tratamiento para una enfermedad, trastorno o afección que está mediada por los polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c, que comprenden administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto modulador de PCSK9b o PCSK9c identificado mediante un método proporcionado en el presente documento.

(Antagonistas) antisentido y ribozimas

Los antagonistas descritos en el presente documento pueden ser ácidos nucleicos que corresponden a las secuencias contenidas en SEC ID Nº: X, o la hebra complementaria de los mismos, y/o secuencias nucleotídicas contenidas en un clon depositado. La secuencia antisentido puede generarse internamente por el organismo, o, puede administrarse por separado la secuencia antisentido (véase, por ejemplo, O'Connor, Neurochem., 56:560 (1991). Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante ADN o ARN antisentido, o mediante la formación de triple hélice. Las técnicas antisentido se discuten, por ejemplo, en Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de triple hélice se discute en, por ejemplo, Lee et al., Nucleic Acids Research, 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); y Dervan et al., Science, 251:1300 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario.

Por ejemplo, se ha descrito anteriormente el uso de construcciones de ARN antisentido de c-myc y c-myb para inhibir el crecimiento de la línea celular de leucemia no linfocítica HL-60 y otras líneas celulares. (Wickstrom et al. (1988); Anfossi et al. (1989)). Estos experimentos se llevaron a cabo *in vitro* incubando células con el oligorribonucleótido. En el documento WO 91/15580 se describe un procedimiento similar para uso *in vivo*. En resumen, se produce del modo siguiente un par de oligonucleótidos para un ARN antisentido dado: Se flanquea una secuencia complementaria a las primeras 15 bases del marco abierto de lectura por un sitio de EcoR1 en el extremo 5' y un sitio de HindIII en el extremo 3'. A continuación, el par de oligonucleótidos se calienta a 90 °C durante un minuto y después se hibrida en tampón de ligamiento 2X (TRIS HCl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, ditioneitol 10 mM (DTT) y ATP 0,2 mM) y después se ligan al sitio de EcoRI/Hind III del vector retroviral PMV7 (documento WO 91/15580).

Por ejemplo, la porción 5' codificante de un polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la presente invención puede usarse como un oligonucleótido de ARN antisentido de desde aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción, evitando de este modo la transcripción y la producción del receptor. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido receptor.

El ácido nucleico antisentido de la invención puede producirse intracelularmente mediante transcripción a partir de una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN) de la invención. Dicho vector contendrá una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido de la invención. Dicho vector puede permanecer episómico o integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir en ARN antisentido deseado. Dichos vectores pueden construirse mediante métodos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, virales, u otros conocidos en la materia, usados para la replicación y expresión en células de vertebrado. La expresión de la secuencia que codifica un polipéptido de la invención, o fragmentos de las mismas, puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica que actúe en células de vertebrados, preferentemente de ser humano. Dichos promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Dichos promotores incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature, 29:304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., Cell, 22:787-797 (1980), el promotor de timidina de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 78:1441-1445 (1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature, 296:39-42 (1982)), etc.

Los ácidos nucleicos antisentido de la invención comprenden una secuencia complementaria a al menos una porción de un transcrito de ARN de un gen de interés. Sin embargo, la complementariedad absoluta, aunque se prefiere, no es necesaria. Una secuencia "complementaria a al menos una porción de un ARN" citada en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad como para ser capaz de hibridar con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de los ácidos nucleicos antisentido bicatenarios de la invención, puede ensayarse por lo tanto una sola hebra del ADN bicatenario, o puede ensayarse la formación de triple hebra. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, podrá contener más desparejamientos de bases con una secuencia de ARN de la invención y aún así formar un dúplex estable (o una triple hebra según sea el caso). Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de desparejamiento usando procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos que son complementarios con el extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, debe funcionar de una manera lo más eficaz en la inhibición de la traducción. Sin embargo, las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de los ARNm han demostrado ser eficaces para inhibir también la traducción de los ARNm. Véanse de manera general, Wagner, R., Nature, 372:333-335 (1994). Por lo tanto, pueden usarse oligonucleótidos complementarios a las regiones 5' o 3' no traducidas y no codificantes de una secuencia polinucleotídica de la invención en una estrategia antisentido para inhibir la traducción de ARNm endógeno. Los oligonucleótidos complementarios con la región 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos complementarios a regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción pero pueden usarse de acuerdo con la invención. Ya estén diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deben ser de al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferentemente oligonucleótidos que oscilan entre 6 y 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos al menos 50 nucleótidos.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser mono o bicatenarios. Los ARN bicatenarios pueden diseñarse basándose en las enseñanzas de Paddison et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 99:1443-1448 (2002), y en las Publicaciones Internacionales N° WO 01/29058, y WO 99/32619.

En el presente documento se contemplan específicamente reactivos de ARNpi. Dichos reactivos son útiles para inhibir la expresión de los polinucleótidos de la presente invención y pueden tener eficacia terapéutica. Se conocen varios métodos en la técnica para el tratamiento terapéutico de trastornos mediante la administración de reactivos de ARNpi. Uno de dichos métodos se describe por Tiscornia et al (PNAS, 100(4):1844-1848 (2003)); WO0409769, presentado el 18 de julio de 2003; y Reich SJ et al., Mol Vis. 2003 30 de mayo; 9:210-6.

Los polinucleótidos de la invención pueden ser ADN, ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de la base, resto del azúcar, o estructura de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir receptores de la célula hospedadora *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989). Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 84:648-652 (1987). Publicación PCT N°: WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación PCT N°: WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión activados por hibridación, (Véase, por ejemplo, Krol et al., BioTechniques, 6:958-976 (1988)) o agentes intercalantes, (Véase, por ejemplo, Zon, Pharm. Res., 5:539-549 (1988)). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente reticulante activado por hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión activado por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopentiladenina, 1-metilguanina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado entre el grupo que incluye, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos una estructura de fosfato modificada seleccionada entre el grupo que incluye, pero sin limitación, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidoato, un fosfordiamidoato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo, y un formacetal o análogo del mismo.

El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido α -anomérico. Un oligonucleótido α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, al contrario que las unidades b habituales, las hebras se sitúan en paralelo entre sí (Gautier et al., Nucl. Acids Res., 15:6625-6641 (1987)). El oligonucleótido es un 2-O-metilribonucleótido (Inoue et al., Nucl. Acids Res., 15:6131-6148 (1987)), o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al., FEBS Lett. 215:327-330 (1987)).

Los polinucleótidos de la invención pueden sintetizarse mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de sintetizadores de ADN automatizados (tales como los comercialmente disponibles a través de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). A modo de ejemplo, los oligonucleótidos de fosforotioato pueden sintetizarse mediante el método de Stein et al. (Nucl. Acids Res., 16:3209 (1988)), los oligonucleótidos de metilfosfonato pueden prepararse mediante el uso de soportes poliméricos de vidrio de poro controlado (Sarin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85:7448-7451 (1988)), etc.

Aunque pueden usarse los oligonucleótidos antisentido complementarios a la secuencia de la región codificante de la invención, se prefieren aquellos complementarios a la región no traducida transcrita.

Los antagonistas potenciales tal como se describen en el presente documento también incluyen ARN catalítico, o una ribozima (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver et al, Science, 247:1222-1225 (1990). Aunque pueden usarse ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento de sitio específico para destruir los ARNm correspondientes a los polinucleótidos de la invención, se prefiere el uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo escinden a los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe en más detalle en Haseloff y Gerlach, Nature, 334:585-591 (1988). Hay numerosos sitios de escisión de ribozimas cabeza de martillo potenciales en cada secuencia nucleotídica divulgada en el listado de secuencias. Preferentemente, la ribozima se diseña por ingeniería genética de tal forma que el sitio de reconocimiento de escisión se sitúa próximo al extremo 5' del ARNm correspondiente a los polinucleótidos de la invención; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

Como en la estrategia antisentido, las ribozimas descritas en el presente documento pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, ara una estabilidad, direccionamiento, etc. mejorados) y deben administrarse a células que expresan los polinucleótidos de la invención *in vivo*. Las construcciones de ADN que codifican la ribozima pueden introducirse en la célula del mismo modo descrito anteriormente para la introducción de

ADN codificante antisentido. Un método preferido de administración implica usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tales como, por ejemplo, el promotor de pol III o pol II, de tal forma que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir mensajes endógenos e inhibir la traducción. Ya que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para tener eficacia.

Los compuestos antagonistas/agonistas pueden emplearse para inhibir los efectos del crecimiento celular y la proliferación de los polipéptidos de la presente invención en células y tejidos neoplásicos, es decir, estimulación de la angiogénesis de tumores, y, por lo tanto, retrasar o prevenir el crecimiento y la proliferación celular anormal, por ejemplo, en la formación o crecimiento de tumores.

El antagonista/agonista también puede emplearse para evitar enfermedades hipervasculares, y evitar la proliferación de células lenticulares epiteliales después de la cirugía de cataratas extracapsular. La prevención de la actividad mitogénica de los polipéptidos de la presente invención también puede ser deseable en casos tales como la restenosis después de la angioplastia con balón.

El antagonista/agonista también puede emplearse para prevenir el crecimiento de tejido cicatrizal durante la curación de heridas.

El antagonista/agonista también puede emplearse para tratar, prevenir, y/o diagnosticar las enfermedades descritas en el presente documento.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para tratar o prevenir enfermedades, trastornos, y/o afecciones, incluyendo, pero sin limitación, las enfermedades, trastornos, y/o afecciones listadas a lo largo de la presente memoria descriptiva, asociadas con la sobreexpresión de un polinucleótido de la presente invención administrando a un paciente (a) una molécula antisentido dirigida al polinucleótido de la presente invención, y/o (b) una ribozima dirigida al polinucleótido de la presente invención.

Asociaciones bióticas

Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento puede aumentar la capacidad del organismo, de forma directa o indirecta, para iniciar y/o mantener asociaciones bióticas con otros organismos. Dichas asociaciones pueden ser simbióticas, no simbióticas, endosimbióticas, macrosimbióticas, y/o de naturaleza microsimbiótica. En general, un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede aumentar la capacidad del organismo para formar asociaciones bióticas con cualquier miembro de los reinos, phylums, familias, clases, géneros o especies bacterianas, de líquenes, de micorrizas, cianobacterianas, de dinoflagelados, y/o de algas.

El mecanismo mediante el cual un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento puede aumentar la capacidad del organismo hospedador, de forma directa o indirecta, para iniciar y/o mantener asociaciones bióticas es variable, aunque puede incluir modular la osmolaridad hasta niveles deseados para el simbiote, modular el pH hasta niveles deseados para el simbiote, modular la secreción de ácidos orgánicos, modular la secreción de proteínas específicas, compuestos fenólicos, nutrientes, o la expresión aumentada de una proteína necesaria para las interacciones de los organismos hospedadores-bióticos (por ejemplo, un receptor, ligando, etc.). Se conocen mecanismos adicionales en la técnica (véase, por ejemplo, "Microbial Signalling and Communication", eds., R. England, G. Hobbs, N. Bainton, y D. McL. Roberts, Cambridge University Press, Cambridge, (1999)).

Como alternativa, un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento puede disminuir la capacidad del organismo hospedador para formar asociaciones bióticas con otro organismo, de forma directa o indirecta. El mecanismo mediante el cual un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento puede disminuir la capacidad del organismo hospedador, de forma directa o indirecta, para iniciar y/o mantener asociaciones bióticas con otro organismo es variable, aunque puede incluir modular la osmolaridad a niveles no deseados, modular el pH a niveles no deseados, modular la secreción de ácidos orgánicos, modular la secreción de proteínas específicas, compuestos fenólicos, nutrientes, o la expresión disminuida de una proteína necesaria para las interacciones de los organismos hospedadores-bióticos (por ejemplo, un receptor, ligando, etc.). Se conocen mecanismos adicionales en la técnica y se encuentran abarcados por la invención (véase, por ejemplo, "Microbial Signalling and Communication", eds., R. England, G. Hobbs, N. Bainton, y D. McL. Roberts, Cambridge University Press, Cambridge, (1999)).

La capacidad del hospedador para mantener asociaciones bióticas con un patógeno particular tiene implicaciones significativas para la salud general y forma física del hospedador. Por ejemplo, los hospedadores humanos tienen simbiosis con bacterias entéricas en sus tractos gastrointestinales, particularmente en el intestino delgado y grueso. De hecho, los recuentos bacterianos en las heces del colon distal a menudo se aproximan a 10^{12} por mililitro de heces. Los ejemplos de flora intestinal en el tracto gastrointestinal son miembros de las enterobacterias, bacteriodes, además

de estreptococos α -hemolíticos, *E. coli*, bifidobacterias, cocos anaerobios, eubacterias, costridia, lactobacilos, y levaduras. Dichas bacterias, entre otras cosas, ayudan al hospedador a asimilar nutrientes degradando alimentos que no se degradan normalmente por el sistema digestivo del hospedador, particularmente en el intestino del hospedador. Por lo tanto, aumentar la capacidad del hospedador para mantener dicha asociación biótica puede ayudar a asegurar la nutrición adecuada del hospedador.

Las aberraciones en la población entérica bacteriana de mamíferos, particularmente seres humanos, se ha asociado con los siguientes trastornos: diarrea, íleus, enfermedad inflamatoria crónica, obstrucción intestinal, divertículos duodenales, enfermedad de los cálculos biliares, y malnutrición. Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento son útiles para tratar, detectar, diagnosticar, pronosticar, y/o mejorar, de forma directa o indirecta, cualquiera de las enfermedades y/o trastornos anteriormente mencionados asociados con la población de flora entérica aberrante.

La composición de la flora intestinal, por ejemplo, se basa en diversos factores, que incluyen, pero sin limitación, la edad, raza, la dieta, malnutrición, acidez gástrica, excreción de sales biliares, motilidad intestinal, y mecanismos inmunitarios. Como resultado, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo agonistas, antagonistas y fragmentos de los mismos, pueden modular la capacidad de un hospedador para formar asociaciones bióticas afectando, directa o indirectamente, a al menos uno o más de estos factores.

Aunque la flora intestinal predominante comprende organismos anaerobios, un porcentaje subyacente representa aerobios (por ejemplo, *E. coli*). Esto es significativo ya que dichos aerobios se convierten rápidamente en los organismos predominantes en las infecciones intraabdominales, llegando a ser oportunistas de manera eficaz al comienzo de la patogénesis de la infección. Como resultado, hay una necesidad intrínseca de controlar poblaciones aerobias, particularmente para individuos inmunocomprometidos.

Preferentemente, los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo agonistas, antagonistas y fragmentos de los mismos, son útiles para inhibir las asociaciones bióticas con organismos simbioses entéricos específicos en un esfuerzo para controlar la población de dichos organismos.

Las asociaciones bióticas suceden no solo en el tracto gastrointestinal, sino también sobre y en el tegumento. En oposición a la flora gastrointestinal, la flora cutánea está compuesta prácticamente a partes iguales entre organismos aerobios y anaerobios. Los ejemplos de flora cutánea son miembros de los cocos Gram-positivos (por ejemplo, *S. aureus*, estafilococos negativos a coagulasa, micrococcos, *M. sedentarius*), bacilos gram positivos (por ejemplo, especies de *Corynebacterium*, *C. minutissimum*, especies de *Brevibacterium*, especies de *Propionibacterium*, *P. acnes*), bacilos Gram-negativos (por ejemplo, especies de *Acinebacter*), y hongos (*Pityrosporum orbiculare*). El número relativamente bajo de flora asociada al tegumento se basa en la incapacidad de muchos organismos para adherirse a la piel. Los organismos citados anteriormente han adquirido esta capacidad única. Por lo tanto, los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden tener usos que incluyen modular la población de la flora cutánea, de forma directa o indirecta.

Las aberraciones en la flora cutánea se asocian con una número significativo de enfermedades y/o trastornos, que incluyen, pero sin limitación, los siguientes: impétigo, ectima, dactulitis distal bullosa, pústulas, foliculitis, abscesos cutáneos, queratólisis picada, tricomicosis axilaris, complejo de dermatoficosis, olor axilar, eritrasma, olor de pies similar al queso, acné, tiña vesicolor, dermatitis seborréica, y foliculitis por fitoesporas, por nombrar solo algunos. Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento son útiles para tratar, detectar, diagnosticar, pronosticar, y/o mejorar, de forma directa o indirecta, cualquiera de las enfermedades y/o trastornos anteriormente mencionados asociados con la población de flora cutánea aberrante.

Las asociaciones bióticas adicionales, incluyendo enfermedades y trastornos asociados con el crecimiento aberrante de dichas asociaciones, se conocen en la técnica y están abarcadas por la invención. Véase, por ejemplo, "Infectious Disease", segunda edición, Eds., S.L., Gorbach, J.G., Bartlett, y N.R., Blacklow, W.B., Saunders Company, Filadelfia, (1998)).

Feromonas

En otra realización, un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento puede aumentar la capacidad de un organismo para sintetizar y/o liberar una feromona. Dicha feromona puede, por ejemplo, alterar el comportamiento y/o metabolismo de un organismo.

Un polinucleótido o polipéptido de la presente invención y/o un agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento puede modular la biosíntesis y/o liberación de feromonas, la capacidad del organismo para responder a las feromonas (por ejemplo, conductualmente, y/o metabólicamente), y/o la capacidad del organismo para detectar feromonas. Preferentemente, cualquiera de las feromonas, y/o agentes volátiles liberados por el organismo, o inducidos por un polinucleótido o polipéptido de la invención y/o un agonista o antagonista tal como se describe en el presente documento tienen efectos conductuales en el organismo.

Otras actividades

- 5 El polipéptido de la presente invención, como resultado de la capacidad para estimular el crecimiento de células endoteliales vasculares, puede emplearse en el tratamiento para estimular la revascularización de tejidos isquémicos debido a varias patologías, tales como trombosis, arteriosclerosis, y otras afecciones cardiovasculares. Estos polipéptidos pueden emplearse también para estimular la angiogénesis y la regeneración de extremidades, según se ha discutido anteriormente.
- 10 El polipéptido también puede emplearse para tratar heridas debidas a lesiones, quemaduras, reparación postoperatoria de tejidos, y úlceras ya que son mitogénicos para varias células de diferentes orígenes, tales como fibroblastos y células del músculo esquelético, y por lo tanto, facilitan la reparación o el reemplazo del tejido dañado o enfermo.
- 15 El polinucleótido de la presente invención también puede emplearse para estimular el crecimiento neuronal y para tratar, prevenir, y/o diagnosticar el daño neuronal que sucede en determinados trastornos neuronales o afecciones neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y el complejo relacionado con el SIDA. El polipéptido de la invención puede tener la capacidad de estimular el crecimiento de condrocitos, por lo tanto, puede emplearse para potenciar la regeneración ósea y periodontal y ayudar en los trasplantes de tejido o injertos óseos.
- 20 Los polipéptidos de la presente invención pueden emplearse para estimular el crecimiento y la diferenciación de las células hematopoyéticas y de las células de médula ósea cuando se usan en combinación con otras citocinas.
- 25 El polipéptido de la invención también puede emplearse para mantener los órganos antes del trasplante o para soportar el cultivo celular de tejidos primarios.
- El polipéptido de la presente invención también puede emplearse para inducir la diferenciación de tejido de origen mesodérmico en los embriones tempranos.
- 30 El polipéptido o los polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento también pueden aumentar o disminuir la diferenciación o proliferación de células madre embrionarias, además de, tal como se discutió anteriormente, de linaje hematopoyético.
- 35 El polipéptido o los polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas descritos en el presente documento también pueden usarse para modular características de mamíferos, tales como altura corporal, peso, color del pelo, color de ojos, piel, porcentaje de tejido adiposo, pigmentación, tamaño, y forma (por ejemplo, cirugía cosmética). De manera similar, los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento pueden usarse para modular el metabolismo de
- 40 mamíferos que afecta al catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización y almacenamiento de la energía.
- Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento pueden usarse para alterar el estado mental o físico influenciando los biorritmos, los ritmos circadianos, la depresión (incluyendo enfermedades, trastornos, y/o afecciones depresivas), tendencia a la violencia,
- 45 tolerancia al dolor, capacidades reproductivas (preferentemente mediante actividad similar a la de activina o inhibina), niveles hormonales o endocrinos, apetito, libido, memoria, estrés, u otras cualidades cognitivas.
- Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento también pueden usarse para preparar a individuos para viajes fuera de la tierra, ambientes de
- 50 baja gravedad, exposición prolongada a niveles de radiación extraterrestres, niveles bajos de oxígeno, reducción de la actividad metabólica, exposición a patógenos extraterrestres, etc. Dicho uso puede administrarse bien antes de un evento extraterrestre, durante un evento extraterrestre, o ambos. Además, dicho uso puede dar como resultado una serie de cambios beneficiosos en el receptor, tales como, por ejemplo, uno cualquiera de los siguientes efectos no limitantes: un nivel aumentado de células hematopoyéticas, particularmente glóbulos rojos de la sangre que podrían
- 55 ayudar al receptor a soportar niveles bajos de oxígeno; un nivel aumentado de linfocitos B, linfocitos T, células presentadoras de antígenos, y/o macrófagos, que podrían ayudar al receptor a soportar la exposición a patógenos extraterrestres, por ejemplo; una inhibición temporal (es decir, reversible) de la producción de células hematopoyéticas que podría ayudar al receptor a soportar la exposición a niveles de radiación extraterrestre; aumento y/o estabilidad de la masa ósea, que podría ayudar al receptor a soportar ambientes de baja gravedad; y/o un metabolismo disminuido
- 60 que podría facilitar de manera eficaz la capacidad de los receptores para prolongar su viaje extraterrestre mediante uno cualquiera de los siguientes medios no limitantes: (i) ayudar al receptor disminuyendo sus necesidades energéticas diarias basales; (ii) disminuir de manera eficaz el nivel de estrés oxidativo y/o metabólico en el receptor (es decir, para permitir al receptor soportar los niveles de radiación extraterrestre aumentados disminuyendo el nivel de daño interno oxidativo/metabólico adquirido durante los requisitos de energía basales normales; y/o (iii) permitir que el
- 65 receptor subsista a una temperatura metabólica menor (es decir, ambiente criogénico y/o subcriogénico).

Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento también pueden usarse para aumentar la eficacia de una composición farmacéutica, de forma directa o indirecta. Dicho uso puede administrarse en conjunción simultánea con dicho agente farmacéutico, o de manera separada mediante bien la misma ruta de administración o una distinta (por ejemplo, intravenosa para el polinucleótido o polipéptido de la presente invención, y oral para el agente farmacéutico, entre otras descritas en el presente documento).

Los polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención y/o los agonistas o antagonistas tal como se describen en el presente documento también pueden usarse como aditivo o conservante alimentario, tal como para aumentar o disminuir las capacidades de almacenamiento, contenido de grasas, lípidos, proteína, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, cofactores u otros componentes nutricionales.

También se prefiere un método para el tratamiento de un individuo que necesita un nivel aumentado de actividad de una proteína, comprendiendo dicho método administrar a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un polipéptido aislado, polinucleótido, o anticuerpo de la invención reivindicada eficaz para aumentar el nivel de dicha actividad de proteína en dicho individuo.

Habiendo descrito la invención de manera general, la misma se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración no pretenden ser limitantes.

La copia física de la secuencia

El listado adjunto al presente documento, además de su correspondiente formato legible por ordenador, se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

REFERENCIAS

- Lusis, A J. Atherosclerosis. Nature. 407, 233-241 (2000).
 Fredrickson, D S., Levy, R I. y Lees, R S. N. Eng. J Med. 276, 273-281 (1967).
 Austin, M A., King, M C., Bawol, R D., Hulley, S B. y Friedman, G D. Am. J Epidemiol. 125, 308-318 (1987).
 Perusse, L. Arteriosclerosis. 9, 308-318 (1989).
 Rice, T., Vogler, G P., Laskarzewski, P M., Perry, T S. y Rao, D C. Hum. Biol. 63, 419-439 (1991).
 Khachadurian, A K., Am. J Med. 37, 402-407, (1964).
 Morganroth, J., Levy, R I., McMahon, A E. y Gotto, AM Jr. J Pediatr. 85, 639-643 (1974).
 Goldstein, J L. y Brown, M S., Johns Hopkins Med. J 143, 8-16 (1978).
 Brown, M S. y Goldstein, J L. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96, 11041-11048 (1999).
 Varret, M. et al. Am. J. Hum. Genet. 64, 1378-1387 (1999).
 Innerarity, T L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84, 6919-6923 (1987).
 Hunt, S C. et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20, 1089-1093 (2000).
 Horton J. D., Cohen J. C., Hobbs H. H. 2007. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. Trends in Biochem. Sci. 33(2): 71-77.
 Berge, K. E., Ose L, Leren, T. P. 2006. Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 26(5): 1094-1100.
 Zhao Z, Tuakli-Wosornu, Y, Lagace T.A., Kinch L., Grishin N. V., Horton J. D., Cohen J. C., Hobbs H. H. 2006. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK and identification of a compound heterozygote. Amer. J. Human Gen. 79: 514-523.
 Sun X.-M, Eden E. r., Tosi I., Neuwirth C. K., Wile D., Naoumova R. P., Soutar A. K. 2005. Evidence for effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia. Hum Mol. Gen. 14(9). 1161-1169.
 Maxwell K. N., Breslow J. L. 2004. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. Proc. Nat. Amer. Sci. 101: 7100-7105.
 Benjannet S, Rhainds, D., Essalmani R., Mayne J., Wickham L., Jin W., Asselin M.-C., Hamelin J., Varret M., Allard D., Trillard M., Abifadel M., Tebon A., Attie A. D. Rader D. J., Boileau C., Brissette L., Chretien M., Prat A., Seidah N. G. 2004. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants. J. Bio. Chem. 279: 48865-48875.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - MÉTODO DE CLONACIÓN DEL NUEVO POLINUCLEÓTIDO DE PCSK9b HUMANO DE LA PRESENTE INVENCION

Usando la secuencia AK124635.1, se diseñó un oligo 80-mero sentido con biotina en el extremo 5' con la siguiente secuencia:

**5'bGGCGCTTTACCAAGTGGCTGGGATGTGCTCTGTAGTTTCTGTGTGTTAACTAT
 AAGGTTGACTTTATGCTCATTCCCTCC-3' (SEC ID Nº: 7)**

Se añadió un microlitro (200 picogramos) del oligo biotinilado a seis microlitros (seis microgramos) de una biblioteca de ADNc de cerebro circular cerrada monocatenaria antisentido y siete microlitros de formamida al 100 % en un tubo de PCR de 0,2 ml. La mezcla se calentó en un ciclador termal a 95 °C durante 2 minutos. Se añadieron catorce microlitros de tampón de hibridación 2X (formamida al 50 %, NaCl 1,5 M, NaPO₄ 0,04 M pH 7,2, EDTA 5 mM, SDS al 0,2 %) a la mezcla calentada de sonda/biblioteca de ADNc y se calienta a 42 °C durante 24 horas. Se aislaron los híbridos entre el oligo biotinilado y el ADNc circular diluyendo la mezcla de hibridación hasta 228 microlitros en una solución que contiene NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se añadieron 125 microlitros de perlas magnéticas de estreptavidina. Esta solución se incubó a 42 °C durante 60 minutos mezclando cada 5 minutos para resuspender las perlas. Las perlas se separaron de la solución con un imán y se lavaron tres veces en 200 microlitros de SSPE 0,1 X, SDS al 0,1 % a 45 °C.

Los ADNc monocatenarios se liberaron del complejo de oligo biotinilado/perla magnética de estreptavidina añadiendo 50 microlitros de NaOH 0,1 M e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron seis microlitros de acetato de sodio 3 M junto con 20 microgramos de glucógeno y la solución se precipitó con etanol con 120 microlitros de etanol al 100 %. El ADN se resuspendió en 12 microlitros de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0).

El ADNc monocatenario se convirtió en bicatenario en un ciclador termal mezclando 5 microlitros del ADN capturado con 1,5 microlitros de cebador de reparación de sentido génico específico 10 micromolar con la siguiente secuencia: 5'-CTAGGCCTCCCTTTCTTGT -3' (SEC ID N°: 13), y 1,5 microlitros de tampón de PCR 10X. La mezcla se calentó a 95 °C durante 20 segundos, después se enfrió escalonadamente hasta 59 °C. En este momento se añadieron 15 microlitros de una mezcla de reparación, que se había precalentado a 70 °C, (la mezcla de reparación contiene 0,5 microlitros de dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno), 1,5 microlitros de tampón de PCR 10X, 12,75 microlitros de agua, y 0,25 microlitros o 1,25 U de polimerasa Taq). Se volvió a calentar escalonadamente la temperatura hasta 73 °C y se incubó durante 23 minutos. El ADN reparado se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 microlitros de TE. Se electroporaron dos microlitros en células DH12S de *E. coli* y las colonias resultantes se exploraron mediante la PCR, usando un par de cebadores diseñado a partir de la secuencia AK124635.1, para identificar los ADNc adecuados.

Oligos usados para identificar el ADNc mediante PCR:

PCSK9-int3s	5'-CTAGGCCTCCCTTTCTTGT-3' (SEC ID N°: 8)
PCSK9-int3a	5'-TTCCAAGGTGACATTTGTGG-3' (SEC ID N°: 9)

Se exploraron 95 colonias, y un clon de ADNc fue positivo mediante la PCR. Se obtuvo la secuencia de longitud completa.

La secuencia nucleotídica de longitud completa y el polipéptido codificado para PCSK9b se muestran en las Figuras 1A-C.

El análisis de esta secuencia indicó que era una variante de proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9).

EJEMPLO 2 - MÉTODO DE CLONACIÓN DEL NUEVO POLINUCLEÓTIDO DE PCSK9c HUMANO DE LA PRESENTE INVENCION

Se utilizó un método prácticamente idéntico al método descrito en el Ejemplo 1 para clonar la variante PCSK9c con las excepciones siguientes. A partir de la secuencia NM_174936.2, se diseñó un oligo 80-mero antisentido con biotina en el extremo 5' con la siguiente secuencia:

**5' bTGGCAGGCGGCGTTGAGGACGCGGCTGTACCCACCCGCCAGGGGCAGCAGCA
CCACCAGTGGCCCCACAGGCTGGACCA -3' (SEC ID N°: 14).**

y se hibridó con una biblioteca de ADNc sentido de cerebro/testículo circular cerrada covalentemente monocatenaria tal como se describe anteriormente. Después de la liberación del complejo oligo biotinilado/perla magnética de estreptavidina, el ADNc se precipitó tal como se ha descrito anteriormente. El ADNc monocatenario se convirtió en bicatenario tal como se describe anteriormente salvo que se usó el siguiente cebador de reparación antisentido específico de gen: 5'- GAGTAGAGGCAGGCATCGTC -3' (SEC ID N°: 17). La exploración de colonias para identificar los ADNc adecuados se llevó a cabo con los siguientes cebadores para PCR:

PCSK9-ex6s	5'- GCCTGGAGTTTATTCGGA-3' (SEC ID N°: 15)
PCSK9-ex6a	5'- GAGTAGAGGCAGGCATCGTC-3' (SEC ID N°: 16)

Se exploraron 95 colonias, y un clon de ADNc fue positivo mediante la PCR. Se obtuvo la secuencia de longitud completa del ADNc. También se descubrió que este clon representa una variante de proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9).

La secuencia nucleotídica de longitud completa y el polipéptido codificado para PCSK9c se muestran en las Figuras 1A-D.

EJEMPLO 3 - MÉTODO PARA DETERMINAR EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS NUEVOS POLIPÉPTIDOS DE PCSK9B Y PCSK9C DE LA PRESENTE INVENCION USANDO FUENTES TISULARES Y CELULARES DE ARNm EXPANDIDAS

El ARN total de los tejidos se aisló usando el protocolo TRIZOL® (Invitrogen) y se cuantificó determinando su absorbancia a 260 nm. Se efectuó una determinación de las bandas 18s y 28s de ARN ribosomal mediante electroforesis en gel desnaturalizante para determinar la integridad del ARN.

La secuencia específica que se iba a medir se alineó con genes relacionados encontrados en GENBANK® para regiones de identidad de divergencia de secuencia significativa para maximizar la especificidad del cebador y la sonda. Los cebadores y las sondas específicos de genes se diseñaron usando el programa informático ABI primer express para amplificar amplicones pequeños (150 pares de bases o menos) para maximizar la probabilidad de que los cebadores funcionen con una eficacia del 100 %. Todas las secuencias de cebador/sonda se buscaron contra bases de datos públicas de GenBank para asegurar la especificidad de la diana. Las secuencias de cebador y sonda se diseñaron para hibridar con regiones compartidas tanto por PCSK9b como por PCSK9c, además de con PCSK9 de tipo silvestre. Los cebadores y las sondas se obtuvieron de ABI.

Para PCSK9b y PCSK9c, las secuencias de cebador y sonda fueron las siguientes:

Cebador directo 5'-CCTGCGCGTGCTCAACT-3' (SEC ID N°: 10)
 Cebador inverso 5'-CCGAATAAACTCCAGGCCTATG-3' (SEC ID N°: 11)
 Sonda TAQMAN® 5'-CCGCTAACCGTGCCCTTCCCTTG-3' (SEC ID N°: 12)

Contaminación de ADN

Para determinar el nivel de ADN genómico contaminante en el ARN, el ARN se dividió en 2 alícuotas y se trató una mitad con DNasa libre de RNasa (Invitrogen). Las muestras tratadas y no tratadas con DNasa se sometieron a reacciones de transcripción inversa con (RT+) y sin (RT-) la presencia de transcriptasa inversa. Se llevaron a cabo ensayos TAQMAN® con cebadores específicos de genes (véase más arriba) y se evaluó la contribución del ADN genómico a la señal detectada comparando los ciclos umbrales obtenidos con el ARN tratado con RT+/RT- no-DNasa con los del ARN tratado con RT+/RT- DNasa. La cantidad de señal contribuida por el ADN genómico en el ARN RT- tratado con DNasa tiene que ser menor del 10 % del obtenido con el ARN RT+ tratado con DNasa. En caso contrario, el ARN no se usó en los experimentos reales.

Reacción de transcripción inversa y detección de secuencia

Se hibridaron 100 ng de ARN total tratado con DNasa a 2,5 mM del respectivo cebador inverso específico de gen en presencia de 5,5 mM de cloruro de magnesio calentando la muestra a 72 °C durante 2 min y después enfriando a 55 °C durante 30 min. Se añadieron 1,25 U/μl de transcriptasa inversa MuLv y 500 mM de cada dNTP a la reacción y se incubó el tubo a 37 °C durante 30 min. Después se calentó la muestra a 90 °C durante 5 min para desnaturalizar la enzima.

La detección cuantitativa de secuencia se llevó a cabo en un ABI PRISM® 7700 añadiendo a la reacción retrotranscrita 2,5 mM de cebadores directos e inversos, 2,0 mM de la sonda TAQMAN®, 500 mM de cada dNTP, tampón y 5 U de AMPLITAQ GOLD®. La reacción PCR se mantuvo entonces a 94 °C durante 12 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 15 s y 60 °C durante 30 s.

Manejo de datos

El ciclo umbral (Ct) del tejido de menor expresión (el valor mayor de Ct) se usó como valor basal de expresión y todos los demás tejidos se expresaron como la abundancia relativa para ese tejido calculando la diferencia en valor de Ct entre el valor basal y los demás tejidos y usándolo como exponente en $2^{(\Delta Ct)}$

El perfil de expresión expandido de los polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c se proporciona en la Figura 6, y se describe en otras partes del presente documento. La Tabla IV identifica los tejidos analizados.

TABLA IV

Número	Tejido
1	adiposo_mesentérico_íleo
2	vaso_sanguíneo_cerebral
3	vaso_sanguíneo_pulmonar
4	vaso_sanguíneo_renal
5	amígdala_cerebro
6	cerebelo_cerebro
7	córtex_cingulado_cerebral_anterior
8	córtex_cingulado_cerebral_posterior
9	córtex_cerebral_frontal_medial
10	córtex_cerebral_temporal
11	núcleo_del_rafe_cerebral
12	hipocampo_cerebral
13	hipotálamo_anterior_cerebral
14	hipotálamo_posterior_cerebral
15	locus_coeruleus_cerebral
16	bulbo_raquídeo_cerebral
17	núcleo_accumbens_cerebral
18	sustancia_negra_cerebral
19	mama
20	intestino_ciego
21	colon
22	duodeno
23	aurícula_izquierda_coronaria
24	ventrículo_izquierdo_coronario
25	íleo
26	yeyuno
27	córtex_renal
28	médula_renal
29	pelvis_renal
30	parénquima_hepático
31	bronquio_primario_pulmonar
32	bronqui_terciario_pulmonar

33	parénquima_pulmonar
34	amígdala_glándula_linfática
35	músculo_esquelético
36	esófago
37	páncreas
38	recto
39	médula_espinal
40	antro_del_estómago
41	cuerpo_del_estómago
42	canal_pilórico_del_estómago
43	testículo

EJEMPLO 4 - MÉTODO PARA CARACTERIZAR LOS POLIPÉPTIDOS DE PCSK9B O PCSK9C DE LA PRESENTE INVENCION

- 5 El análisis de expresión de polipéptidos y polinucleótidos de PCSK9b y PCSK9c usando tanto PCR cuantitativa como transferencias de Western, además del efecto de PCSK9b y PCSK9c en la captación de LDL por el LDLR, se evaluó de acuerdo con los métodos indicados generalmente en el presente documento. En resumen:

10 Materiales y métodos

- 10 **Clonación génica.** La variante b de PCSK9 se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro humano, y la variante c se clonó a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro/testículo. Cada producto variante se insertó en dos vectores de expresión CD3 MYCHIS y pEF-DESTS1 marcados con His y V5 o epítopos Myc en el extremo C-terminal (Nº 3114 para variante b de PCSK9-pCD3 MYCHIS, 3115 para variante c de PCSK9-pEF-DESTS1, Nº 3116 para variante c de PCSK9-pCD3 MYCHIS, 3117 para variante c de PCSK9-pEF-DESTS1). PCSK9 de tipo silvestre y el mutante D374 de PCSK9 se clonaron mediante inserción de producto de la PCR en un vector pcDNA3.

- 20 **Cultivo celular.** Todas las líneas celulares, incluyendo HepG2, células de ovario de hámster chino (CHO), y HEK293, se derivaron a partir de la American Type Cell Culture (Manassas, VA). Las células tanto HepG2 como HEK293 se crecieron en medio DMEM (Invitrogen Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (FBS, Gibco), piruvato de sodio 1 mM (Gibco), Glutamax 2 mM (Gibco), sulfato de estreptomicina 100 mg/ml y 100 U/ml de penicilina (Gibco). Las células CHO se crecieron con el medio F12 con Glutamax (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10 %.

- 25 **Ensayo de captación de Dil-LDL.** Se emplacaron 15.000 células por pocillo en la placa de 96 pocillos recubierta en poli D lisina con el medio de crecimiento con FBS al 10 % y se crecieron a 37 °C en un incubador durante toda la noche. En el día dos, el medio se cambió a medio de crecimiento de suero deficiente en lipoproteína al 5 % (LPDS) suplementado con mevalonato sódico 50 µM, y 100 ng/ml de un inhibidor de HMG CoA reductasa. En el día tres, se añadieron alícuotas de LDL marcadas fluorescentemente (Dil-LDL) (fuente: Biomedical Technologies, Stoughton, MA) al medio a una concentración de 10 µg/ml y se continuó incubando durante dos horas más. Se añadió formaldehído a las células a una concentración del 4 % junto con colorante Hoechst a 10 µg/ml. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las células con PBS tres veces y se leyeron en un dispositivo LJL Biosystems (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para el contenido de ADN a una longitud de onda de excitación de 360 nm, y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Las células se lisaron entonces mediante NaOH (0,001 N) y SDS (0,001 %).
- 35 La captación de Dil-LDL se midió en LJL a una longitud de onda de excitación de 540 nm, y una longitud de onda de emisión de 580 nm. Los datos de captación de Dil-LDL se normalizaron al contenido de ADN tomando la relación de la lectura de Dil-LDL con la lectura del colorante de Hoechst.

- 40 **Cuantificación de ARNm.** El aislamiento del ARN total de las células se llevó a cabo mediante el dispositivo 6100 Nucleotide Acid PrepStation (ABI, Foster City, CA). Las células se lisaron mediante la solución de lisis de ácido nucleico (ABI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células lisadas se cargaron en el instrumento para la extracción de ARN basándose en el protocolo sugerido por el fabricante. La cantidad de ARN se midió mediante el dispositivo SPECTRAMAX® Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

- 45 **RT-PCR cuantitativa:** el ADNc se preparó usando los reactivos de síntesis de ADNc iScript (Biorad, Hercules, y CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa se llevó a cabo usando iTaq SYBR® Green Supermix con reactivos ROX (Bio-Rad) en un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT. Las secuencias de

cebador para los ensayos fueron: PCSK9 de tipo silvestre, directo TGTCTTTGCCAGAGCATCC (SEC ID N°: 30), inverso TATTCATCCGCCCGGTACC (SEC ID N°: 31); variante b, directo AGATGTCATCAATGAGGCCT (SEC ID N°: 32), inverso AGCTGCCAACCTGCAAAAAC (SEC ID N°: 33); variante b/c, directo CTCTGAGGTTGTGACTCGTGTGA (SEC ID N°: 34), inverso AGCGTTCTCCACTCCACAAGA (SEC ID N°: 35); LDLR, directo GAGAATGATCTGCAGCACCCA (SEC ID N°: 36), inverso TGCTGATGACGGTGTTCATAGG (SEC ID N°: 37). Los niveles de expresión génica se normalizaron al ARNm de GADPH.

Análisis por transferencia de Western. Las células se emplacaron en DMEM suplementado con FBS al 10 % en placas de 6 pocillos. En el día dos, se transfectaron 4 µg/pocillo de ADN de plásmido mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las sugerencias del fabricante. Después de 24 h, se cambió el medio a medio DMEM con LPDS al 5 %, mevalonato de sodio 50 µM, y 100 ng/ml de BMS-423526. Después de 24 h adicionales, se retiró el medio y se lisaron las células con el tampón que contenía Triton X-100 al 0,1 %, NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) más cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche). La concentración de proteína se ensayó con el ensayo de proteínas BioRad (BioRad). 10 µg de proteínas de lisado o 15 µl de un total de 2 ml de medio condicionado se cargaron en geles de Tris-HCl al 4-15 % (Invitrogen). Después de la transferencia de proteínas, las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti-hPCSK9 o con anticuerpo primario anti-LDLR, seguido de IgG anti-ratón marcada con IRdye 800 para PCSK9 o IgG anti-conejo marcada con IRdye 680 para LDLR. Las bandas de proteínas se detectaron posteriormente usando el sistema de obtención de imágenes infrarrojas ODYSSEY® (Li-Cor, Lincoln, NE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

Sobreexpresión de variantes de PCSK9 en células. Las variantes *b* y *c* de PCSK9 se transfectaron en células HEK y CHO así como en células HepG2. Ambas variantes se expresaron en estas células con niveles de ARNm comparables a las de PCSK9 de tipo silvestre (de longitud completa) y con el mutante de ganancia de función D374Y-PCSK9 (Fig. 7A). Como era de esperar, los niveles de ARNm de LDLR no se vieron afectados por la expresión de los ARNm de PCSK9 en estas células (Fig. 7B), lo que es coherente con estudios anteriores usando variantes conocidas y mutantes de PCSK9 (Maxwell K. N., Breslow J. L., Proc. Nat. Amer. Sci., 101:7100-7105 (2004). Benjannet S., et al., J. Bio. Chem. 279:48865-48875 (2004)). Los resultados de transferencia de Western usando anticuerpo de PCSK9 demostraron que tanto la variante *b* como la variante *c* también se expresaron como proteína en las células transfectadas. La variante *b* se expresó como una proteína de aproximadamente 33 kDa y la variante *c* se expresó como una proteína de aproximadamente 57 kDa (Fig. 8A). Los pesos moleculares aparentes de las proteínas variantes, juzgados mediante movilidad en SDS-PAGE, se correspondieron con su peso molecular predicho a partir del análisis de secuencias. En comparación con la proteína PCSK9 de tipo silvestre, los niveles de expresión de proteínas de las dos variantes fueron menores aunque fácilmente detectables mediante anticuerpos.

En el medio condicionado del cultivo celular, la expresión de proteína tanto de PCSK9-*b* como -*c* se observó mediante transferencia de Western (Fig. 8B), lo que indica que estas dos variantes pueden secretarse por las células.

Las variantes de PCSK9 muestran actividad funcional en el ensayo de captación de Dil-LDL. La captación de Dil-LDL es un ensayo funcional estandarizado para el receptor de LDLR, mientras que la actividad de PCSK9 reduce la de LDLR. Por lo tanto, la captación de Dil-LDL por células puede usarse como un ensayo funcional para la actividad de PCSK9. La expresión transitoria de variante *c* de PCSK9 disminuyó la captación de Dil-LDL en células HepG2, en comparación con el control de vector, lo que indica que la variante *c* es competente para expresar actividad funcional de PCSK9 en LDLR (Fig. 9A). En este ensayo, la variante *c* mostró mayor actividad que PCSK9 de tipo silvestre. La variante *b* mostró mayor actividad que PCSK9 de tipo silvestre, pero fue menor que la variante PCSK9b. Basándose en la deducción de secuencia y en los pesos moleculares observados en las transferencias de Western, la variante PCSK9c parece formar una proteína PCSK9 prácticamente completa (en comparación con la de tipo silvestre), mientras que la variante PCSK9c carece de parte del dominio C-terminal, lo que es coherente con los hallazgos del ensayo de actividad.

De manera coherente al ensayo de captación de Dil-LDL, la expresión de la variante *c* de PCSK9 disminuyó el nivel de proteína LDLR en las células CHO ensayadas mediante transferencia de Western, mientras que la expresión de la variante *b* pareció no afectar al nivel de proteína LDLR en estas condiciones (Fig. 9B).

Conclusiones

Las dos variantes de PCSK9, *b* y *c*, se examinaron en una serie de experimentos para detectar la expresión y función. Estas dos variantes difieren de PCSK9 de tipo silvestre en la ausencia del péptido de señal y del prodominio así como en 22 aminoácidos en el extremo N-terminal del dominio catalítico. En la variante *b*, también está ausente una porción del dominio C-terminal.

Ambas variantes se expresaron a nivel de ARNm en células HepG2 basales (suprimidas con esterol), estando el ARNm aproximadamente a un 1 % del nivel de ARNm de PCSK9 en presencia de medio que contiene suero fetal bovino al 10 % (datos no mostrados). Se sabe que el medio que contiene suero fetal bovino (FBS) al 10 % suprime genes sensibles a esterol, incluyendo PCSK9. Sin embargo, en condiciones que incluyen suero deficiente en

lipoproteínas al 5 % (LPDS) en el medio, que se sabe que induce genes sensibles a esterol, incluyendo PCSK9, el ARNm de la variante PCSK9c estaba elevadamente inducido, alcanzando los niveles aproximadamente un 10 % del nivel de ARNm de PCSK9 de tipo silvestre (datos no mostrados). La expresión transitoria de las dos variantes usando vectores de expresión plasmídicos estándar en líneas celulares de mamífero dio como resultado que la variante PCSK9b estuviese expresada como una proteína de 33 kDa, y que la variante PCSK9c se expresase como una proteína de 57 kDa. Ambas proteínas variantes de PCSK9 fueron detectables en medio condicionado así como en lisados celulares, lo que indica que ambas pueden secretarse a partir de células. Basándose en el ensayo de captación de Dil-LDL y en los datos de la transferencia de Western, la expresión transitoria de la variante c disminuyó los niveles de LDLR en células, mientras que la variante b mostró efectos más leves.

Estos datos sugieren que las nuevas variantes de PCSK9, especialmente la variante c, no solo se expresan, sino que son funcionalmente competentes y muestran actividad de PCSK9 interactuando con el LDLR y disminuyendo los niveles de LDLR, la principal función identificada para PCSK9 de tipo silvestre hasta la fecha. Los datos apoyan un papel biológico para las nuevas variantes en la modulación del LDLR y sugieren que son útiles en biotecnología y en aplicaciones de investigación que implican la expresión, función, y exploración de PCSK9.

EJEMPLO 5 - MÉTODO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE PROTEINAS DE LOS POLIPÉPTIDOS DE PCSK9B O PCSK9C DE LA PRESENTE INVENCION

Pueden utilizarse una serie de ensayos conocidos en la técnica para demostrar la actividad de proteinasa de los polipéptidos de PCSK9b y PCSK9c de la presente invención. Específicamente, puede utilizarse el método expuesto de manera general en Naureckiene et al. (Arch. Biochem. Biophys., 420:55-67 (2003)). En resumen:

Expresión de PCSK9b y PCSK9c

Pueden transformarse células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) con prN1(Δ SP; Δ C@Q453)/6xHis. Los transformantes se crecen en medio LB (suplementado con 100 μ g/ml de carbenicilina) a 30 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,6. La expresión se induce con IPTG 0,1 mM y el cultivo se crece durante 3,5 h adicionales. Las células se recogen mediante centrifugación durante 30 min a 14.000 g, y se almacenan a -80 °C.

Purificación de PCSK9b y PCSK9c

Pueden llevarse a cabo los procedimientos a 4 °C. Se resuspenden las células de 2 l de cultivo en 25 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; glicerol al 10 %; y NDSB 1 M) en presencia o ausencia de un cóctel inhibidor de proteinasa libre de EDTA (Roche). Después de la lisis celular mediante sonicación, los restos celulares se retiran mediante centrifugación (30 min, 14.000 g). El sobrenadante que contiene proteínas solubles se carga en una columna de agarosa pre-equilibrada con 1 ml de ácido Ni-nitrilotriacético (NTA) (Qiagen). La columna se lava con 20 ml de tampón de lisis que contiene imidazol 20 mM para eliminar las proteínas contaminantes débilmente unidas. La proteína purificada se eluye con 5 ml de tampón de lisis que contiene imidazol 200 mM. La proteína eluida se dializa durante toda la noche frente a 1 l de tampón A: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y glicerol al 10 %. La proteína dializada se carga en una columna de 1 ml MONO Q® (Amersham Biosciences) equilibrada con el mismo tampón. La columna se lava con 10 ml del mismo tampón y las proteínas se eluyen con 12 ml de gradiente de NaCl (0,05-1,0 M) en el mismo tampón. Se recogen fracciones de un mililitro y se analiza su pureza mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contienen proteína purificada se agrupan y dializan frente a 1000 ml de tampón de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM, y glicerol al 10 %), se alícuotan, y se almacenan a -80 °C. Paralelamente, se lleva a cabo una purificación a partir de células transformadas con vector pET21a vacío para generar material para su uso como control negativo en ensayos enzimáticos.

Ensayo de actividad de proteinasa

Los sustratos fluorogénicos específicos de subtilisina, furina, y TTP pueden comprarse a través de Bachem. Los sustratos de proteinasa a medida pueden sintetizarse por New Englan Peptide, Inc. Las secuencias de los sustratos peptídicos son las siguientes:

Péptido	Secuencia
A	Dnp-FAQSIPK-AMC (SEC ID N°: 18)
B	Dnp-DSLVSFAK-AMC (SEC ID N°: 19)
C	Dnp-FANAIPK-AMC (SEC ID N°: 20)

La actividad proteolítica puede ensayarse a 37 °C usando sustrato 100 μ M y enzima 0,12 μ M en diversos tampones, incluyendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 a pH 11, CaCl₂ de 1 mM a 20 mM, y TX-100 al 0,5 % a 37 °C. La proteína derivada de una transformación con vector vacío se incluye como control negativo para la actividad enzimática. Las medidas fluorométricas continuas y de punto final pueden llevarse a cabo en un espectrofotómetro (λ_{ex} =350 nm, λ_{em} =450 nm).

EJEMPLO 6 - MÉTODO DE EXPLORACIÓN DE COMPUESTOS QUE INTERACTÚAN CON EL POLIPÉPTIDO DE PCSK9B O PCSK9C

5 Los siguientes ensayos se diseñaron para identificar compuestos que se unen al polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, que se unen a otras proteínas celulares que interactúan con el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, y para compuestos que interfieren con la interacción del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c con otras proteínas celulares.

10 Dichos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, otras proteínas celulares. Específicamente, dichos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, péptidos, tales como, por ejemplo, péptidos solubles, incluyendo, pero sin limitación péptidos de fusión con cola de Ig, que comprenden porciones extracelulares de receptores transmembrana de polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, y miembros de bibliotecas peptídicas aleatorias (véase, por ejemplo, Lam, K. S. et al., 1991, Nature 354:82-84; Houghton, R. et al., 1991, Nature 354:84-86), hechos de aminoácidos de configuración D y/o L, fosfopéptidos (incluyendo, pero sin limitación, miembros de bibliotecas de fosfopéptidos aleatorios o parcialmente degenerados; véase, por ejemplo, Songyang, Z., et al., 1993, Cell 72:767-778), anticuerpos (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados anti-idiotípicos, quiméricos o monocatenarios, y fragmentos de biblioteca de expresión FAb, F(ab')₂ y FAb, y fragmentos de unión a epítipo de los mismos), y moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas.

20 Los compuestos identificados mediante ensayos tales como aquellos descritos en el presente documento pueden ser útiles, por ejemplo, para deducir la función biológica del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, y para mejorar los síntomas de la progresión tumoral, por ejemplo. En los casos, por ejemplo, en los que un estado o trastorno de progresión tumoral sea el resultado de un nivel general menor de expresión de PCSK9b o PCSK9c, de polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, y/o de actividad de polipéptido de PCSK9b o PCSK9c en una célula implicada en el estado o trastorno de progresión tumoral, los compuestos que interactúan con el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c pueden incluir aquellos que acentúan o amplifican la actividad del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c unido. Dichos compuestos pueden provocar un aumento efectivo en el nivel de actividad del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, mejorando de este modo los síntomas del trastorno o estado de progresión tumoral. En los casos en los cuales las mutaciones en el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c causan la producción de polipéptidos de PCSK9b o PCSK9c aberrantes que tienen un efecto perjudicial que da lugar a la progresión tumoral, pueden identificarse compuestos que se unen al polipéptido de PCSK9b o PCSK9c que inhiben la actividad del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c unido. Los ensayos para ensayar la efectividad de dichos compuestos se conocen en la técnica y se discuten en otras partes del presente documento.

EJEMPLO 7 - MÉTODO PARA IDENTIFICAR COMPUESTOS QUE INTERFIEREN CON LA INTERACCIÓN DE POLIPÉPTIDO DE PCSK9B O PCSK9C/PRODUCTO CELULAR

El polipéptido de PCSK9b o PCSK9c de la invención puede, *in vivo*, interactuar con una o más macromoléculas celulares o extracelulares, tales como proteínas. Dichas macromoléculas incluyen, pero sin limitación, polipéptidos, particularmente ligandos de PCSK9, y aquellos productos identificados mediante los métodos de exploración descritos en otras partes del presente documento. Para los fines de esta discusión, dichas macromoléculas celulares y extracelulares se citan en el presente documento como "compañeros de unión". Para los fines de la presente invención, "compañero de unión" también puede abarcar polipéptidos, compuestos de molécula pequeña, polisacáridos, lípidos, y cualquier otra molécula o tipo de molécula citado en el presente documento. Los compuestos que alteran dichas interacciones pueden ser útiles para regular la actividad del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, especialmente del polipéptido mutante de PCSK9b o PCSK9c. Dichos compuestos pueden incluir, pero sin limitación, moléculas, tales como anticuerpos, péptidos, y similares descritos en otras partes del presente documento.

El principio básico de los sistemas de ensayo usados para identificar compuestos que interfieren con las interacciones entre el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y su compañero o compañeros de unión celulares o extracelulares implica preparar una mezcla de reacción que contiene al polipéptido de PCSK9b o PCSK9c, y al compañero de unión en condiciones y durante un tiempo suficiente como para permitir que los dos productos interactúen y se unan, formando de este modo un complejo. Para ensayar la actividad inhibidora de un compuesto, se prepara la mezcla de reacción en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo puede incluirse inicialmente en la mezcla de reacción, o puede añadirse en un momento posterior a la adición del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y su compañero de unión celular o extracelular. Las mezclas de reacción de control se incuban con el compuesto de ensayo o con un placebo. Entonces se detecta la formación de cualquier complejo entre el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y el compañero de unión celular o extracelular. La formación de un complejo en la reacción de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto interfiere con la interacción del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y el compañero de unión interactivo. Adicionalmente, la formación de complejo en las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y polipéptido de PCSK9b o PCSK9c normal también puede compararse con la formación de complejo en las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y polipéptido de PCSK9b o PCSK9c mutante. Esta comparación puede ser importante en aquellos casos en los que es deseable identificar compuestos que alteran las interacciones de polipéptido de PCSK9b o PCSK9c mutante pero no normal.

El ensayo para compuestos que interfieren con la interacción del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y compañeros de unión puede llevarse a cabo en un formato heterogéneo u homogéneo. Los ensayos heterogéneos implican anclar bien el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c o el compañero de unión sobre una fase sólida y detectar complejos anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En ensayos homogéneos, la reacción completa se lleva a cabo en una fase líquida. En cualquier estrategia, puede variarse el orden de adición de reactivos para obtener información diferente acerca de los compuestos que se están ensayando. Por ejemplo, los compuestos de ensayo que interfieren con la interacción entre el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y los compañeros de unión, por ejemplo, mediante competición, pueden identificarse llevando a cabo la reacción en presencia de la sustancia de ensayo; es decir, añadiendo la sustancia de ensayo a la mezcla de reacción antes de o de manera simultánea con el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y el compañero de unión interactivo celular o extracelular. Como alternativa, los compuestos de ensayo que alteran los complejos preformados, por ejemplo, compuestos con constantes de unión mayores que desplazan uno de los componentes del complejo, pueden ensayarse añadiendo el compuesto de ensayo a la mezcla de reacción después de que se hayan formado los complejos. Los diversos formatos se describen brevemente a continuación.

En un sistema de ensayo heterogéneo, se ancla bien el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c o el compañero de unión interactivo celular o extracelular sobre una superficie sólida, mientras que la especie no anclada se marca, de forma directa o indirecta. En la práctica, se utilizan de manera conveniente en placas de microtitulación. Las especies ancladas pueden inmovilizarse mediante uniones no covalentes o covalentes. La unión no covalente puede lograrse simplemente recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c o compañero de unión y secando. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado específico para la especie que se va a anclar para anclar la especie a la superficie sólida. Las superficies pueden prepararse previamente y almacenarse.

Para llevar a cabo el ensayo, el compañero de las especies inmovilizadas se expone a la superficie recubierta con o sin el compuesto de ensayo. Después de que esté completa la reacción, se retiran los componentes no reaccionados (por ejemplo, mediante lavado) y permanecerá cualquier complejo formado inmovilizado sobre la superficie sólida. La detección de complejos anclados sobre la superficie sólida puede lograrse de diversas formas. En los casos donde la especie no inmovilizada está marcada previamente, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que se formaron complejos. En los casos donde la especie no inmovilizada no está marcada previamente, puede usarse un marcador indirecto para detectar complejos anclados sobre la superficie, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado específico para la especie no inmovilizada inicialmente (el anticuerpo, a su vez, puede estar marcado directamente o marcado indirectamente con un anticuerpo anti-Ig marcado). Dependiendo del orden de adición de los componentes de reacción, pueden detectarse los compuestos de ensayo que inhiben la formación de complejos o que alteran los complejos preformados.

Como alternativa, la reacción puede llevarse a cabo en una fase líquida en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, los productos de reacción pueden separarse de los componentes que no han reaccionado, y los complejos pueden detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo inmovilizado específico para uno de los componentes de unión para anclar cualquier complejo formado en solución, y un anticuerpo marcado específico para el otro compañero para detectar complejos anclados. De nuevo, dependiendo del orden de adición de reactivos a la fase líquida, pueden identificarse los compuestos de ensayo que inhiben a los complejos o que alteran a los complejos preformados.

Como alternativa, puede usarse un ensayo homogéneo. En esta estrategia, se prepara un complejo preformado del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y del producto de compañero de unión interactivo celular o extracelular en el que bien el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c o sus compañeros de unión están marcados, pero la señal generada por el marcador se inactiva debido a la formación de complejo (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.109.496 de Rubenstein que utiliza esta estrategia para inmunoensayos). La adición de una sustancia de ensayo que compite con y desplaza una de las especies del complejo preformado dará como resultado la generación de una señal por encima del fondo. De este modo, pueden identificarse sustancias de ensayo que alteran la interacción polipéptido de PCSK9b o PCSK9c - compañero de unión celular o extracelular.

En una realización particular, el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c puede prepararse para su inmovilización usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, la región codificante del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c puede fusionarse a un gen de glutatión-S-transferasa (GST) usando un vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, de tal manera que su actividad de unión se mantiene en el producto de fusión resultante. El producto interactivo celular o extracelular puede purificarse y usarse para provocar un anticuerpo monoclonal usando métodos practicados de manera rutinaria en la técnica y descritos anteriormente. Este anticuerpo puede marcarse con el isótopo radioactivo ¹²⁵I, por ejemplo, mediante métodos practicados rutinariamente en la técnica. En un ensayo heterogéneo, por ejemplo, el producto de fusión de GST-polipéptido de PCSK9b o PCSK9c puede anclarse a perlas de glutatión-agarosa. El producto de compañero de unión interactivo celular o extracelular puede añadirse entonces en presencia o ausencia del compuesto de ensayo de tal forma que permite que suceda la interacción y la unión. Al final del periodo de reacción, el material no unido puede eliminarse por lavado, y el anticuerpo monoclonal marcado puede añadirse al sistema y dejar que se una a los componentes complejados. Puede detectarse la interacción entre el polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y el compañero de unión interactivo celular o extracelular midiendo la cantidad de radioactividad que permanece asociada a las perlas de glutatión-agarosa. Una inhibición satisfactoria de la interacción por el compuesto de ensayo dará como resultado una disminución en la radioactividad medida.

Como alternativa, pueden mezclarse juntos el producto de fusión de GST-polipéptido de PCSK9b o PCSK9c y el producto compañero de unión interactivo celular o extracelular en líquido en ausencia de las perlas de glutatión-agarosa sólidas. El compuesto de ensayo puede añadirse bien durante o después de los compañeros de unión y dejarlos interactuar. Esta mezcla puede añadirse entonces a las perlas de glutatión-agarosa y eliminarse por lavado el material no unido. De nuevo, el alcance de la inhibición de la interacción del compañero de unión puede detectarse añadiendo el anticuerpo marcado y midiendo la radioactividad asociada con las perlas.

Pueden emplearse estas mismas técnicas usando fragmentos peptídicos que corresponden a los dominios de unión del producto polipeptídico de PCSK9b o PCSK9c y el compañero de unión interactivo celular o extracelular (en caso de que el compañero de unión sea un producto), en lugar de uno o ambos productos de longitud completa.

Puede usarse cualquier método practicado de manera rutinaria en la técnica para identificar y aislar el sitio de unión de la proteína. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis de uno de los genes que codifican uno de los productos y explorar la disrupción de la unión en un ensayo de inmunoprecipitación conjunta. Pueden seleccionarse mutaciones compensadoras en el gen que codifica la segunda especie en el complejo. El análisis de secuencia de los genes que codifican los productos respectivos revelará las mutaciones que correspondan a la región del producto implicada en la unión interactiva. Como alternativa, puede anclarse un producto a una superficie sólida usando métodos descritos anteriormente en esta sección, y dejarse interactuar con y unirse a su compañero de unión marcado, que se ha tratado con una enzima proteolítica, tal como tripsina. Después de lavar, un péptido corto marcado que comprende el dominio de unión puede permanecer asociado con el material sólido, que puede aislarse e identificarse mediante secuenciación de aminoácidos. Asimismo, una vez se ha obtenido el gen que codifica el compañero de unión celular o extracelular, pueden diseñarse segmentos génicos cortos para expresar fragmentos peptídicos del producto, que después pueden ensayarse para actividad de unión y purificarse o sintetizarse.

EJEMPLO 8 - AISLAMIENTO DE UN CLON ESPECÍFICO DE LA MUESTRA DEPOSITADA

El material depositado en la muestra a la que se le asigna el número de depósito de la ATCC® citado en la Tabla I para cualquier clon de ADNc dado puede contener también uno o más plásmidos adicionales, comprendiendo cada uno un clon de ADNc diferente del de ese clon dado. Por lo tanto, los depósitos que comparten el mismo número de depósito de la ATCC® contienen al menos un plásmido para cada clon de ADNc identificado en la Tabla I. Normalmente, cada muestra de depósito de la ATCC® citada en la Tabla I comprende una mezcla de cantidades aproximadamente iguales (en peso) de aproximadamente 1-10 ADN de plásmido, conteniendo cada uno un clon de ADNc diferente y/o un clon parcial de ADNc; pero dicha muestra de depósito puede incluir plásmidos para más o menos de 2 clones de ADNc.

Pueden usarse dos estrategias para aislar un clon particular a partir de la muestra depositada de ADN de plásmido citada para ese clon en la Tabla I. En primer lugar, se aísla un plásmido directamente explorando los clones que usan una sonda polinucleotídica correspondiente a SEC ID N°: 1.

En particular, se sintetiza un polinucleótido específico con 30-40 nucleótidos usando un sintetizador de ADN de Applied Biosystems de acuerdo con la secuencia comunicada. El oligonucleótido se marca, por ejemplo, con ³²P-(-ATP usando polinucleótido cinasa T4 y se purifica de acuerdo con métodos rutinarios, (por ejemplo, Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). La mezcla de plásmido se transforma en un hospedador adecuado, tal como se indica anteriormente (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) usando técnicas conocidas para los expertos en la materia, tales como aquellas proporcionadas por el proveedor del vector o en publicaciones relacionadas o patentes citadas anteriormente. Los transformantes se emplazan en placas de agar al 1,5 % (que contienen el agente de selección adecuado, por ejemplo, ampicilina) hasta una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Estas placas se exploran usando membranas de nailon de acuerdo con métodos rutinarios para exploración de colonias bacterianas (por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, páginas 1.93 a 1.104), u otras técnicas conocidas para los expertos en la materia.

Como alternativa, se sintetizan dos cebadores de 17-20 nucleótidos derivados de ambos extremos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 (es decir, dentro de la región de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 unido mediante el 5' NT y el 3' NT del clon definido en la Tabla I) y se usan para amplificar el ADNc deseado usando el plásmido de ADNc depositado como molde. La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en condiciones rutinarias, por ejemplo, en 25 µl de mezcla de reacción con 0,5 µg del molde de ADNc anterior. Una mezcla de reacción conveniente es 1,5-5 ml de MgCl₂, gelatina al 0,01 % (p/v), 20 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol de cada cebador y 0,25 unidades de polimerasa Taq. Se llevan a cabo treinta y cinco ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C durante 1 min; hibridación a 55 °C durante 1 min; elongación a 72 °C durante 1 min) con un ciclador termal automatizado Cetus de Perkin-Elmer. El producto amplificado se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa y se corta y purifica la banda de ADN con el peso molecular esperado. El producto de la PCR se verifica para que sea de la secuencia seleccionada subclonando y secuenciando el producto de ADN.

Los polinucleótidos de la presente invención, el polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, o el polipéptido codificado por el clon depositado puede representar versiones parciales o incompletas de la región codificante completa (es decir, en gen de longitud completa). Se conocen varios métodos en la técnica para la

identificación de las porciones 5' o 3' no codificantes y/o codificantes de un gen que pueden no estar presentes en el clon depositado. Los métodos siguientes son ejemplares y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, sondado en filtro, enriquecimiento de clones usando sondas específicas, y protocolos similares o idénticos a protocolos "RACE" 5' y 3' que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, hay disponible un método similar a RACE 5' para generar el extremo 5' ausente de un transcrito de longitud completa deseado. (Fromont-Racine et al., *Nucleic Acids Res.* 21(7):1683-1684 (1993)).

En resumen, se liga un oligonucleótido de ARN específico a los extremos 5' de una población de ARN que contiene presumiblemente transcritos de ARN de genes de longitud completa. Se usa un conjunto de cebador que contiene un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para una secuencia conocida del gen de interés para amplificar mediante la PCR la porción 5' del gen de longitud completa deseado. Este producto amplificado puede entonces secuenciarse y usarse para generar el gen de longitud completa.

Este método anterior comienza con el ARN total aislado de la fuente deseada, aunque puede usarse poli-A + ARN. La preparación de ARN puede tratarse entonces con fosfatasa en caso necesario para eliminar los grupos fosfato 5' en el ARN degradado o dañado que pueda interferir con la etapa posterior de ARN ligasa. Entonces debe inactivarse la fosfatasa y tratarse el ARN con pirofosfatasa ácida del tabaco para eliminar la estructura de tapón presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ARN al que se le ha escindido el tapón, que después puede ligarse a un oligonucleótido de ARN usando ARN ligasa T4.

Esta preparación de ARN modificado se usa como molde para la síntesis de la primera hebra de ADNc usando un oligonucleótido específico de gen. La reacción de síntesis de la primera hebra se usa como molde para la amplificación por la PCR del extremo 5' deseado usando un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen de interés. Entonces se secuencian el producto resultante y se analiza para confirmar que la secuencia del extremo 5' pertenece al gen deseado. Además, puede ser ventajoso optimizar el protocolo RACE para aumentar la probabilidad de aislar secuencias 5' o 3' codificantes o no codificantes. Se conocen en la técnica varios métodos para optimizar un protocolo RACE, aunque puede encontrarse una descripción detallada que resume estos métodos en B.C. Schaefer, *Anal. Biochem.*, 227:255-273, (1995).

Un método alternativo para llevar a cabo RACE 5' o 3' para la identificación de secuencias codificantes o no codificantes se proporciona por Frohman, M.A., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85:8998-9002 (1988). En resumen, puede reconstruirse un clon de ADNc que carece del extremo 5' o 3' para que incluya los pares de bases ausentes que se extienden al codón de inicio o detención traduccional, respectivamente. En algunos casos, los ADNc carecen del comienzo de la traducción, para este fin. A continuación se describe brevemente una modificación de este procedimiento original RACE 5'. Los ARN poli A+ o totales retrotranscritos con SUPERScript® II (Gibco/BRL) o un cebador complementario o antisentido específico para la secuencia de ADNc. El cebador se retira de la reacción con un concentrador MICROCON® (Amicon). Posteriormente se añade la coa a la primera hebra de ADNc con dATP y desoxinucleótido transferasa terminal (Gibco/BRL). Por lo tanto, se produce una secuencia de ancla que es necesaria para la amplificación mediante la PCR. La segunda hebra se sintetiza a partir de la cola de dA en tampón de PCR, ADN polimerasa Taq (Perkin-Elmer Cetus), un cebador de oligo-dT que contiene tres sitios de restricción adyacentes (XhoI, SalI y ClaI) en el extremo 5' y un cebador que contiene solo estos sitios de restricción. Este ADNc bicatenario se amplifica mediante la PCR durante 40 ciclos con los mismos cebadores así como un cebador antisentido específico de ADNc anidado. Los productos de la PCR se separan por tamaños en un gel de bromuro de etidio-agarosa y se retira la región del gel que contiene productos de ADNc del tamaño predicho de ADN que codifica la proteína ausente. El ADNc se purifica a partir de la agarosa con el kit Magic PCR Prep (Promega), digerido por restricción con XhoI o SalI, y se liga a un plásmido, tal como PBLUESCRIPT® SKII (Stratagene) en los sitios de XhoI y EcoRV. Este ADN se transforma en bacterias y los clones del plásmido se secuencian para identificar las inserciones codificantes de proteína correctas. Los extremos 5' correctos se confirman comparando esta secuencia con el homólogo identificado de manera putativa se solapan con el clon de ADNc parcial. Se usan métodos similares conocidos en la técnica y/o kits comerciales para amplificar y recuperar los extremos 3'.

Hay varios kits con control de calidad disponibles para su compra. Se suministran reactivos y métodos similares a los anteriores en forma de kit a través de Gibco/BRL para RACE tanto 5' como 3' para la recuperación de genes de longitud completa. Hay un segundo kit disponible a través de Clontech que es una modificación de una técnica relacionada, SLIC (ligamiento monocatenario a ADNc monocatenario), desarrollado por Dumas et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:5227-32(1991). Las principales diferencias de procedimiento son que el ARN se hidroliza de manera alcalina después de la transcripción inversa y se usa ARN ligasa para unir cebador de ancla que contiene un sitio de restricción a la primera hebra de ADNc. Esto obvia la necesidad de la reacción de adición de cola de dA, lo que da como resultado una serie de poliT que es difícil de secuenciar.

Una alternativa a la generación de ADNc 5' o 3' a partir de ARN es el uso de ADN bicatenario de biblioteca de ADNc. Se sintetiza una hebra asimétrica de ADNc antisentido amplificada mediante la PCR con un cebador antisentido específico de ADNc y un cebador anclado a plásmido. Estos cebadores se retiran y se lleva a cabo una reacción PCR simétrica con un cebador antisentido específico de ADNc anidado y el cebador anclado a plásmido.

Protocolo de ARN ligasa para generar las secuencias 5' o 3' terminales para obtener genes de longitud

completa

Una vez se ha identificado un gen de interés, hay disponibles varios métodos para la identificación de las porciones 5' o 3' del gen que pueden no estar presentes en el plásmido de ADNc original. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, sondado en filtro, enriquecimiento de clones usando sondas y protocolos específicos similares e idénticos a RACE 5' y 3'. Aunque el gen de longitud completa puede estar presente en la biblioteca y puede identificarse mediante sondado, un método útil para generar el extremo 5' o 3' es usar la información de secuencia existente del ADNc original para generar la información ausente. Hay disponible un método similar a RACE 5' para generar el extremo 5' ausente de un gen de longitud completa deseado. (Este método se publicó por Fromont-Racine et al., *Nucleic Acids Res.*, 21(7): 1683-1684 (1993)). En resumen, se liga un oligonucleótido de ARN específico a los extremos 5' de una población presumiblemente de 30 ARN que contiene el transcrito de ARN de longitud completa y se usa un conjunto de cebadores que contiene un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para una secuencia conocida del gen de interés para amplificar mediante la PCR la porción 5' del gen de longitud completa deseado que posteriormente puede secuenciarse y usarse para generar el gen de longitud completa. Este método comienza con el ARN total aislado de la fuente deseada, puede usarse ARN de poli A pero no es un requisito previo para este procedimiento. La preparación de ARN puede tratarse entonces con fosfatasa en caso necesario para eliminar los grupos fosfato 5' en el ARN degradado o dañado que pueda interferir con la etapa posterior de ARN ligasa. En caso de usar la fosfatasa esta se inactiva y se trata el ARN con pirofosfatasa ácida de tabaco para eliminar la estructura de tapón presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ARN al que se le ha escindido el tapón, que después puede ligarse a un oligonucleótido de ARN usando ARN ligasa T4. Esta preparación de ARN modificado puede usarse como molde para la síntesis de la primera hebra de ADNc usando un oligonucleótido específico de gen. La reacción de síntesis de la primera hebra puede entonces usarse como molde para la amplificación por la PCR del extremo 5' deseado usando un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen relacionado con la apoptosis de interés. Entonces se secuencia el producto resultante y se analiza para confirmar que la secuencia del extremo 5' pertenece al gen relevante relacionado con la apoptosis.

EJEMPLO 9 - EXPRESIÓN BACTERIANA DE UN POLIPÉPTIDO

Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos de la PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, tal como se describe en el presente documento, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores usados para amplificar la inserción de ADNc debe contener preferentemente sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI, y el extremo 5' de los cebadores para clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión bacteriana pQE-9. (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Este vector plasmídico codifica resistencia a antibióticos (Ampr), un origen de replicación bacteriano (ori), un promotor/operador regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión a ribosomas (RBS), un marcador de 6 histidinas (6-His), y sitios de clonación de enzima de restricción.

El vector pQE-9 se digiere con BamHI y XbaI y el fragmento amplificado se liga en el vector pQE-9 que mantiene el marco de lectura iniciado en el RBS bacteriano. La mezcla de ligamiento se usa entonces para transformar la cepa M15/rep4 de *E. coli* (Qiagen, Inc.) que contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor de lacI y también confiere resistencia a kanamicina (Kanr). Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. El ADN de plásmido se aísla y confirma mediante análisis de restricción.

Los clones que contienen las construcciones deseadas se crecen durante toda la noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB suplementado tanto con Amp (100 µg/ml) y Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usa para inocular un gran cultivo a una proporción de 1:100 a 1:250. Las células se crecen hasta una densidad óptica a 600 (D.O.600) de entre 0,4 y 0,6. Después se añade IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. El IPTG induce activando el represor lacI, eliminando el P/O dando lugar a expresión génica aumentada.

Las células se crecen durante 3 a 4 horas adicionales. Después se recogen las células mediante centrifugación (20 min a 6000Xg). El sedimento de células se solubiliza en el agente caotrópico guanidina HCl 6 molar agitando durante 3-4 horas a 4 °C. Los restos celulares se retiran mediante centrifugación, y el sobrenadante que contiene el polipéptido se carga en una columna de resina de afinidad de níquel-nitrilo-ácido triacético ("Ni-NTA") (disponible a través de QIAGEN, Inc., anteriormente citado). Las proteínas con un marcador 6 x His se unen a la resina de Ni-NTA con alta afinidad y pueden purificarse en un procedimiento sencillo en una sola etapa (para detalles véase: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., anteriormente citado).

En resumen, el sobrenadante se carga en la columna en guanidina-HCl 6 M, pH 8, primeramente se lava la columna con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6M, pH 8, después se lava con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6 M, pH 6, y finalmente se eluye el polipéptido con guanidina-HCl 6 M, pH 5.

La proteína purificada se renaturaliza después dializando contra tampón de suero salino tamponado con fosfato (PBS) o Na-acetato 50 mM, pH 6 más NaCl 200 mM. Como alternativa, la proteína puede volver a plegarse satisfactoriamente mientras está inmovilizada en la columna de Ni-NTA. Las condiciones recomendadas son las siguientes: renaturalización usando un gradiente lineal de urea 6 M-1 M en NaCl 500 mM, glicerol al 20 %, Tris/HCl 20 mM pH 7,4, que contenía inhibidores de proteasas. La renaturalización debe llevarse a cabo durante un periodo de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización las proteínas se eluyen mediante la adición de imidazol 250 mM. El imidazol se retira mediante una etapa final de diálisis contra PBS o tampón de acetato de sodio 50 mM pH 6 más 200 mM de NaCl. La proteína purificada se almacena a 4 °C o se congela a -80 °C.

10 EJEMPLO 10 - PURIFICACIÓN DE UN POLIPÉPTIDO A PARTIR DE UN CUERPO DE INCLUSIÓN

El siguiente método alternativo puede usarse para purificar un polipéptido expresado en *E. coli* cuando está presente en forma de cuerpos de inclusión. A menos que se especifique lo contrario, todas las etapas siguientes se llevan a cabo a 4-10 °C.

Tras terminar la fase de producción de la fermentación de *E. coli*, el cultivo celular se enfría a 4-10 °C y las células se recogen mediante centrifugación continua a 15.000 rpm (Heraeus Sepatech). Basándose en el rendimiento de proteína esperado por unidad de peso de pasta celular y en la cantidad de proteína purificada necesaria, se suspende una cantidad adecuada de pasta celular, en peso, en una solución de tampón que contiene Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4. Las células se dispersan hasta una suspensión homogénea usando un mezclador de alta cizalla.

Después se lisan las células pasando la solución a través de un microfluidizador (Microfluidics, Corp. o APV Gaulin, Inc.) dos veces a 19,3-41,36 MPa. El homogenizado se mezcla entonces con solución de NaCl hasta una concentración final de NaCl 0,5 M, seguido de centrifugación a 7000 xg durante 15 min. El precipitado resultante se lava de nuevo usando NaCl 0,5 M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4.

Los cuerpos de inclusión resultantes lavados se solubilizan con clorhidrato de guanidinio (GuHCl) 1,5 M durante 2-4 horas. Después de centrifugar a 7000 xg durante 15 min, se retira el precipitado y se incuban el sobrenadante que contiene polipéptido a 4 °C durante toda la noche para permitir la extracción adicional de GuHCl.

Después de centrifugar a alta velocidad (30.000 xg) para eliminar las partículas insolubles, la proteína solubilizada en GuHCl se vuelve a plegar mezclando rápidamente el extracto de GuHCl con 20 volúmenes de tampón que contiene sodio 50 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM mediante agitación vigorosa. La solución de proteína diluida y plegada de nuevo se mantiene a 4 °C sin mezclar durante 12 horas antes de las etapas de purificación adicionales.

Para aclarar la solución de polipéptido vuelto a plegar, se emplea una unidad de filtración tangencial preparada previamente equipada con un filtro de membrana de 0,16 µm con un área superficial adecuada (por ejemplo, Filtron), equilibrada con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0. La muestra filtrada se carga sobre una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, POROS® HS-50, Perceptive Biosystems). La columna se lava con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0 y se eluye con NaCl 250 mM, 500 mM, 1000 mM, y 1500 mM en el mismo tampón, paso a paso. Se controla de manera continua la absorbancia a 280 nm del efluente. Se recogen las fracciones y se analizan mediante SDS-PAGE.

Las fracciones que contienen el polipéptido se agrupan y se mezclan con 4 volúmenes de agua. La muestra diluida se carga entonces en un conjunto preparado previamente de columnas en tándem de resinas de intercambio aniónico fuertes (POROS® HQ-50, Perceptive Biosystems) y aniónico débiles (POROS® CM-20, Perceptive Biosystems). Las columnas se equilibran con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0. Ambas columnas se lavan con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0, NaCl 200 mM. La columna CM-20 se eluye usando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna que varían desde NaCl 0,2 M, acetato de sodio 50 mM, pH 6,0 hasta NaCl 1,0 M, acetato de sodio 50 mM, pH 6,5. Las fracciones se recogen con control constante a A280 del efluente. Entonces se agrupan las fracciones que contienen el polipéptido (determinado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE al 16 %).

El polipéptido resultante debe mostrar una pureza de más del 95 % después de las etapas anteriores de plegamiento y purificación. No deberían observarse bandas de contaminante importantes en el gel de SDS-PAGE al 16 % teñido con azul de Coomassie cuando se cargan 5 µg de proteína. La proteína purificada también puede ensayarse para contaminación por endotoxina/LPS, y el contenido de LPS es normalmente menor de 0,1 ng/ml de acuerdo con ensayos LAL.

60 EJEMPLO 11 - CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN POLIPÉPTIDO EN UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS

En este ejemplo, se usa el vector lanzadera plasmídico pAc373 para insertar un polinucleótido en un baculovirus para que exprese un polipéptido. Un vector de expresión de baculovirus típico contiene el promotor fuerte de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) seguido de sitios de restricción convenientes, que pueden incluir, por ejemplo, BamHI, Xba I y Asp718. A menudo se usa el sitio de poliadenilación del virus de simio 40 ("SV40") para una poliadenilación eficaz. Para una selección fácil del virus recombinante, el plásmido contiene el gen de beta-galactosidasa de *E. coli* bajo el control de un promotor débil de *Drosophila* en la misma orientación, seguido de

la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Los genes insertados están flanqueados a ambos lados por secuencias virales para la recombinación de homólogos mediada por células con ADN viral de tipo silvestre para generar un virus viable que expresa el polinucleótido clonado.

5 Pueden usarse muchos otros vectores de baculovirus en lugar del vector anterior, tales como pVL941 y pAcIM1, como apreciará fácilmente un experto en la materia, siempre que la construcción proporcione señales ubicadas de manera adecuada para la transcripción, traducción, secreción y similares, incluyendo un péptido de señal y un AUG en marco según sea necesario. Dichos vectores se describen, por ejemplo, en Luckow et al., *Virology* 170:31-39 (1989).

10 Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos de la PCR correspondientes a los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, tal como se describe en el presente documento, para sintetizar fragmentos de inserción. Los cebadores usados para amplificar la inserción de ADNc deben contener preferentemente sitios de restricción en el extremo 5' de los cebadores para clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Específicamente, la secuencia de ADNc contenida en el clon depositado, incluyendo el codón de iniciación AUG y la secuencia líder asociada naturalmente identificada en otras partes del presente documento (según sea aplicable), se amplifica usando el protocolo PCR descrito en el presente documento. Si se usa la secuencia de señal de origen natural para producir la proteína, el vector usado no necesita un segundo péptido de señal. Como alternativa, el vector puede modificarse para incluir una secuencia líder de baculovirus, usando los métodos estándar descritos en Summers et al., "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures" Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987).

El fragmento amplificado se aísla de un gel de agarosa al 1 % usando un kit comercialmente disponible (GENECLEAN®, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Después se digiere el fragmento con enzimas de restricción adecuadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa al 1 %.

25 El plásmido se digiere con las enzimas de restricción correspondientes y opcionalmente puede desfosforilarse usando fosfatasa intestinal de ternera, usando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. Después se aísla el ADN a partir de un gel de agarosa al 1 % usando un kit comercialmente disponible (GENECLEAN®, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

30 El fragmento y el plásmido desfosforilado se ligan juntos con ADN ligasa T4. Se transforman células de *E. coli* HB101 u otros hospedadores adecuados de *E. coli* tales como XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) con la mezcla de ligamiento y se dispersan en placas de cultivo. Las bacterias que contienen el plásmido se identifican digiriendo el ADN de colonias individuales y analizando el producto de digestión mediante electroforesis en gel. La secuencia del fragmento clonado se confirma mediante secuenciación de ADN.

35 Se cotransforman cinco µg de un plásmido que contiene el polinucleótido con 1,0 µg de un ADN de baculovirus linealizado comercialmente disponible ("BACULOGOLD® baculovirus DNA", Pharmingen, San Diego, CA), usando el método de lipofección descrito por Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417 (1987). Se mezclan un µg de ADN de virus BACULOGOLD® y 5 µg del plásmido en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contiene 50 µl de medio de Grace sin suero (Life Technologies Inc., Gaithersburgo, MD). Posteriormente, se añaden 10 µl de LIPOFECTIN® más 90 µl de medio de Grace, se mezclan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade gota a gota la mezcla de transcripción a células de insecto Sf9 (ATCC® CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo tisular de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. Después se incuba la placa durante 5 horas a 27 °C. Entonces se retira la solución de transfección de la placa y se añade 1 ml de medio para insecto de Grace suplementado con suero fetal de ternera al 10 %. Entonces se continúa cultivando a 27 °C durante cuatro días.

Después de cuatro días se recoge el sobrenadante y se lleva a cabo un ensayo en placa, tal como se describe por Summers y Smith, anteriormente citado. Se usa un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburgo) para permitir una fácil identificación y aislamiento de los clones que expresan gal, que producen placas con tinción azul. (También puede encontrarse una descripción detallada de "un ensayo de placa" de este tipo en la guía del usuario para cultivo de células de insecto distribuido por Life Technologies Inc., Gaithersburgo, páginas 9-10). Después de la incubación adecuada, se recogen las placas teñidas de azul con la punta de una micropipeta (por ejemplo, Eppendorf). Después se resuspende el agar que contiene los virus recombinantes en un tubo de microcentrifugación que contiene 200 µl de medio de Grace y se usa la suspensión que contiene al baculovirus recombinante para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días después se recogen los sobrenadantes de estas placas de cultivo y después se almacenan a 4 °C.

60 Para verificar la expresión del polipéptido, se crecen las células Sf9 en medio de Grace suplementado con FBS al 10 % inactivado por calor. Las células se infectan con el baculovirus recombinante que contiene el polinucleótido a una multiplicidad de infección ("MOI") de aproximadamente 2. Si se desean proteínas radiomarcadas, se retira el medio 6 horas después y se reemplaza con medio SF900 II menos metionina y cisteína (disponible a través de Life Technologies Inc., Rockville, MD). Después de 42 horas, se añaden 5 µCi de ³⁵S-metionina y 5 µCi de ³⁵S-cisteína (disponibles a través de Amersham). Las células se incuban adicionalmente durante 16 horas y después se recogen mediante centrifugación. Las proteínas en el sobrenadante así como las proteínas intracelulares se analizan mediante SDS-PAGE seguida de autorradiografía (en caso de que estén radiomarcadas).

La microsecuenciación de la secuencia aminoacídica del extremo amino de la proteína purificada puede usarse para determinar la secuencia amino terminal de la proteína producida.

EJEMPLO 12 - EXPRESIÓN DE UN POLIPÉPTIDO EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

El polipéptido de la presente invención puede expresarse en una célula de mamífero. Un vector de expresión de mamífero típico contiene un elemento promotor, que media el inicio de la transcripción de ARNm, una secuencia codificante de proteína, y señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intervinientes flanqueadas por sitios de donante y aceptor para el corte y empalme de ARN. Se logra una transcripción elevadamente eficaz con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones largas terminales (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLVI, HIVI y el promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano).

Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC® 37152), pSV2dhfr (ATCC® 37146), pBC12MI (ATCC® 67109), pCMVSport 2.0, y pCMVSport 3.0. Las células de mamífero que pueden usarse incluyen células Hela, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, células COS 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Como alternativa, el polipéptido puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido integrado en un cromosoma. La co-transformación con un marcador de selección, tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transformadas.

El gen transformado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades de proteína codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o varios miles de copias del gen de interés. (Véase, por ejemplo, Alt, F. W., et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978). Hamlin, J. L. y Ma, C., Biochem. et Biophys. Acta, 1097:107-143 (1990). Page, M. J. y Sydenham, M. A., Biotechnology 9:64-68 (1991).) Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992). Usando estos marcadores, las células de mamífero se crecen en medio de selección y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas celulares contienen el gen o genes amplificados integrados en un cromosoma. A menudo se usan células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO para la producción de proteínas.

Un polinucleótido de la presente invención se amplifica de acuerdo con el protocolo descrito en el presente documento. Si se usa la secuencia de señal de origen natural para producir la proteína, el vector no necesita un segundo péptido de señal. Como alternativa, si no se usa la secuencia de señal de origen natural, el vector puede modificarse para que incluya una secuencia de señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, el documento WO 96/34891). El fragmento amplificado se aísla de un gel de agarosa al 1 % usando un kit comercialmente disponible (GENECLEAN®, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Después se digiere el fragmento con enzimas de restricción adecuadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa al 1 %.

Después se digiere el fragmento amplificado con la misma enzima de restricción y se purifica en un gel de agarosa al 1 %. Después se ligan el fragmento aislado y el vector desfosforilado con ADN ligasa T4. Después se transforman células de *E. coli* HB101 o XL-1 Blue y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC6 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Se usan para la transformación células de ovario de hámster chino que carecen de gen de DHFR activo. Se transforman conjuntamente cinco µg de un plásmido de expresión con 0,5 µg del plásmido pSVneo usando LIPOFECTIN® (Felgner et al., anteriormente citado). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador de selección dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos, incluyendo G418. Las células se siembran en MEM menos alfa suplementado con G418 a 1 mg/ml. Después de 2 días, se tripsinizan las células y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Germany) en MEM menos alfa suplementado con 10, 25, o 50 ng/ml de metotrexato más 1 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días se tripsinizan los clones individuales y se siembran en placas de petri de 6 pocillos o en matraces de 10 ml usando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las mayores concentraciones de metotrexato se transfieren posteriormente a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones aun mayores de metotrexato (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 - 200 µM. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de Western o mediante análisis de HPLC de fase reversa.

EJEMPLO 13 - MÉTODO PARA CREAR MUTANTES DE ELIMINACIÓN N- Y C-TERMINAL CORRESPONDIENTES A POLIPÉPTIDOS DE PCSK9, PCSK9B O PCSK9C DE LA PRESENTE INVENCION

Tal como se describe en otras partes del presente documento, pueden crearse mutantes de eliminación N- y C-terminal, además de cualquier combinación de eliminaciones N- y C-terminales de las mismas, correspondientes al polipéptido de PCSK9, PCSK9b o PCSK9c de la presente invención. Hay disponible una serie de métodos para los expertos en la materia para crear dichos mutantes. Dichos métodos pueden incluir una combinación de metodologías de amplificación mediante la PCR y clonación génica. Aunque un experto en la materia de la biología molecular, mediante el uso de las enseñanzas proporcionadas o citadas en el presente documento, y/o de otro modo conocidas en la técnica como métodos estándar, podría crear fácilmente cada mutante de eliminación de los polipéptidos de la presente invención, los métodos ejemplares se describen más adelante.

En resumen, usando el clon de ADNc aislado que codifica la secuencia de longitud completa del polipéptido de PCSK9b o PCSK9c (tal como se describe en el presente documento, por ejemplo), pueden diseñarse cebadores adecuados de aproximadamente 15-25 nucleótidos derivados de las posiciones 5' y 3' deseadas de SEC ID N°: 1 o de SEC ID N°: 3 o de SEC ID N°: 38 para amplificar mediante la PCR, y posteriormente clonar, el mutante de eliminación N- y/o C-terminal previsto. Dichos cebadores pueden comprender, por ejemplo, un codón de iniciación y de terminación para el cebador 5' y 3', respectivamente. Dichos cebadores también pueden contener sitios de restricción para facilitar la clonación del mutante de eliminación después de la amplificación. Además, los cebadores pueden comprender secuencias adicionales, tales como, por ejemplo, secuencias de marcador flag, secuencias kozac, u otras secuencias discutidas y/o citadas en el presente documento.

Por ejemplo, en el caso del mutante de eliminación de L16 a R315 N-terminal de PCSK9b, podrían usarse los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de ADNc correspondiente a este mutante de eliminación:

Cebador 5'	5'-GCAGCAGCGGCCGCTAGACACCAGCATACAGAGTGACC-3' (SEC ID N°: 22) <i>NotI</i>
Cebador 3'	5'-GCAGCAGTCGACTCTGGGGCGCAGCGGGCGATGGCTG-3' (SEC ID N°: 23) <i>Sall</i>

Por ejemplo, en el caso del mutante de eliminación de M1 a P284 C-terminal de PCSK9b, podrían usarse los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de ADNc correspondiente a este mutante de eliminación:

Cebador 5'	5'-GCAGCAGCGGCCGCTATGTGCGCCTTGAAAGACGGAGGCA-3' (SEC ID N°: 24) <i>NotI</i>
Cebador 3'	5'-GCAGCAGTCGACAGGGCCTGCCCATGGGTGCTGGGG-3' (SEC ID N°: 25) <i>Sall</i>

Por ejemplo, en el caso del mutante de eliminación de L16 a Q523 N-terminal de PCSK9c, podrían usarse los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de ADNc correspondiente a este mutante de eliminación:

Cebador 5'	5'-GCAGCAGCGGCCGCTAGACACCAGCATACAGAGTGACC-3' (SEC ID N°: 26) <i>NotI</i>
Cebador 3'	5'-GCAGCAGCTGACCTGGAGCTCCTGGGAGGCCTGCGCC-3' <i>Sall</i>

Por ejemplo, en el caso del mutante de eliminación de M1 a A306 C-terminal de PCSK9c, podrían usarse los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de ADNc correspondiente a este mutante de eliminación:

Cebador 5'	5'-GCAGCAGCGGCCGCTATGTGCGCCTTGAAAGACGGAGGCA-3' (SEC ID N°: 28) <i>NotI</i>
Cebador 3'	5'-GCAGCAGTCGACGGCGATGGCTGTGGCCATCCGTGTA-3' (SEC ID N°: 29) <i>Sall</i>

Por ejemplo, en el caso del mutante de eliminación de L16 a Q692 N-terminal de PCSK9, podrían usarse los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de ADNc correspondiente a este mutante de eliminación:

Cebador 5'	5'-GCAGCAGCGGCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCC-3' (SEC ID N°: 39) <i>NotI</i>
Cebador 3'	5'-GCAGCA GTCGAC CTGGAGCTCCTGGGAGGCCTGCGCC -3' (SEC ID N°: 40) <i>Sall</i>

Las condiciones de amplificación mediante la PCR representativas se proporcionan a continuación, aunque el experto en la materia apreciará que pueden necesitarse otras condiciones para una amplificación eficaz. Puede prepararse una mezcla de reacción PCR de 100 µl usando 10 ng del ADN molde (clon de ADNc de PCSK9b o PCSK9c), 4dNTPs

200 µM, cebadores 1 µM, 0,25U de ADN polimerasa Taq (PE), y tampón de ADN polimerasa Taq estándar. Las condiciones de ciclado PCR típicas son las siguientes:

20-25 ciclos:	45 s, 93 grados
	2 min, 50 grados
	2 min, 72 grados
1 ciclo:	10 min, 72 grados

- 5 Después de la etapa final de extensión de la PCR, pueden añadirse 5 U de fragmento Klenow e incubarse durante 15 min a 30 grados.

10 Tras la digestión del fragmento con las enzimas de restricción NotI y Sall, el fragmento puede clonarse en un vector de expresión y/o clonación adecuado que se ha digerido de manera similar (por ejemplo, pSport1, entre otros). El experto en la materia apreciará que podrían sustituirse igualmente otros plásmidos, y puede ser deseable en determinadas circunstancias. El fragmento digerido y el vector se ligan posteriormente usando una ADN ligasa, y después se usan para transformar células de *E. coli* competentes usando métodos proporcionados en el presente documento y/o de otro modo conocidos en la técnica.

15 La secuencia de cebador 5' para amplificar cualquier mutante de eliminación N-terminal puede determinarse mediante referencia a la siguiente fórmula: (S+(X * 3)) a ((S+(X * 3))+25), en la que 'S' es igual a la posición de nucleótido del codon inicial de iniciación de PCSK9b (SEC ID N°: 1) o PCSK9c (SEC ID N°: 3) o PCSK9 (SEC ID N°: 38), y 'X' es igual al aminoácido más N-terminal del mutante de eliminación N-terminal previsto. El primer término proporcionará la posición de nucleótido 5' de inicio del cebador 5', mientras que el segundo término proporcionará la posición del nucleótido del extremo 3' del cebador 5' correspondiente a una hebra sentido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 38. Una vez se han determinado las posiciones de nucleótido correspondientes del cebador, puede crearse la secuencia nucleotídica final mediante la adición de secuencias de sitio de restricción aplicables al extremo 5' de la secuencia, por ejemplo. Tal como se cita en el presente documento, puede desearse la adición de otras secuencias al cebador 5' en determinadas circunstancias (por ejemplo, secuencias kozac, etc.).

25 La secuencia de cebador 3' para amplificar cualquier mutante de eliminación N-terminal puede determinarse mediante referencia a la siguiente fórmula: (S+(X * 3)) a ((S+(X * 3))-25), en la que 'S' es igual a la posición de nucleótido del codon inicial de iniciación de PCSK9b (SEC ID N°: 1) o PCSK9c (SEC ID N°: 3) o PCSK9 (SEC ID N°: 38), y 'X' es igual al aminoácido más C-terminal del mutante de eliminación N-terminal previsto. El primer término proporcionará la posición de nucleótido 5' de inicio del cebador 3', mientras que el segundo término proporcionará la posición de nucleótido del extremo 3' del cebador 3' correspondiente a la hebra antisentido de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 38. Una vez se han determinado las posiciones de nucleótido correspondientes del cebador, puede crearse la secuencia nucleotídica final mediante la adición de secuencias de sitio de restricción aplicables al extremo 5' de la secuencia, por ejemplo. Tal como se cita en el presente documento, puede desearse la adición de otras secuencias al cebador 3' en determinadas circunstancias (por ejemplo, secuencias de codon de detención, etc.). El experto en la materia apreciará que pueden ser necesarias modificaciones de las posiciones nucleotídicas anteriores para optimizar la amplificación mediante la PCR.

40 Pueden usarse las mismas fórmulas generales proporcionadas anteriormente para identificar las secuencias de cebador 5' y 4' para amplificar cualquier mutante de eliminación C-terminal de los polipéptidos de la presente invención. Además, pueden usarse las mismas fórmulas generales proporcionadas anteriormente para identificar las secuencias de cebador 5' y 4' para amplificar cualquier combinación de mutante de eliminación N-terminal y C-terminal de los polipéptidos de la presente invención. El experto en la materia apreciará que pueden ser necesarias modificaciones de las posiciones nucleotídicas anteriores para optimizar la amplificación mediante la PCR.

45 EJEMPLO 14 - PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Los polipéptidos de la presente invención están fusionados preferentemente a otras proteínas. Estas proteínas de fusión pueden usarse para diversas aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de los presentes polipéptidos a marcador His, marcador HA, proteína A, dominios de IgG, y proteína de unión a maltosa facilita la purificación. (tal como se describe en el presente documento; véase también el documento EP A 394,827; Traunecker, et al., Nature 331:84-86 (1988)). De manera similar, la fusión a IgG-1, IgG-3, y albúmina aumenta el tiempo de semivida *in vivo*. Las señales de localización nuclear fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden dirigir la proteína a una localización subcelular específica, mientras que los heterodímeros u homodímeros covalentes pueden aumentar o disminuir la actividad de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión también pueden crear moléculas quiméricas que tienen más de una función. Finalmente, las proteínas de fusión pueden aumentar la solubilidad y/o la estabilidad de la proteína fusionada en comparación con la proteína no fusionada. Todos los tipos de proteínas de fusión descritos anteriormente pueden producirse modificando el siguiente protocolo, que describe la fusión de un polipéptido a una molécula de IgG.

En resumen, la porción Fc humana de la molécula de IgG puede amplificarse mediante la PCR usando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita a continuación. Estos cebadores también deben tener sitios de enzima de restricción convenientes que facilitarán la clonación en un vector de expresión, preferentemente un vector de expresión en mamífero. Nótese que el polinucleótido se clona sin un codon de parada, de otro modo no se produciría una proteína de fusión.

La secuencia de señal de origen natural puede usarse para producir la proteína (según sea aplicable). Como alternativa, si no se usa la secuencia de señal de origen natural, el vector puede modificarse para que incluya una secuencia de señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, el documento WO 96/34891 y/o la Patente de Estados Unidos N° 6.066.781, citadas anteriormente).

Región Fc de IgG humana

```

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC
ACCTGAATTCGAGGGTGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCC
ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACGGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGGAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAG
TGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEC ID N°: 21)

```

EJEMPLO 15 - PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO A PARTIR DE UN POLIPÉPTIDO

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante diversos métodos. (Véase, Current Protocols, Capítulo 2). Como ejemplo de dichos métodos, las células que expresan un polipéptido de la presente invención se administran a un animal para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. En un método preferido, se prepara una preparación de la proteína y se purifica para dejarla sustancialmente libre de contaminantes naturales. Dicha preparación se introduce entonces en un animal para producir antisueros policlonales de mayor actividad específica.

En el método más preferido, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión a proteínas de los mismos). Dichos anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando tecnología de hibridoma. (Köhler et al., Nature 256:495 (1975); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Köhler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., págs. 563-681 (1981)). En general, dichos procedimientos implican inmunizar a un animal (preferentemente un ratón) con polipéptido o, más preferentemente, con una célula que expresa polipéptido. Dichas células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo tisular adecuado; sin embargo, es preferible cultivar las células en medio Eagle modificado de Earle suplementado con suero bovino fetal al 10 % (inactivado a aproximadamente 56 °C), y suplementarse con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1.000 U/ml de penicilina, y aproximadamente 100 µg/ml de estreptomycin.

Los esplenocitos de dichos ratones se extraen y fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Puede emplearse cualquier línea celular de mieloma adecuada; sin embargo, es preferible emplear la línea celular parental de mieloma (SP2O), disponible a través de la ATCC®. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen de manera selectiva en medio HAT, y después se clonan mediante dilución limitante tal como se describe por Wands et al. (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas mediante dicha selección se ensayan posteriormente para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de unirse al polipéptido.

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos adicionales capaces de unirse al polipéptido en un procedimiento en dos etapas usando anticuerpos anti-idiotípicos. Dicho método hace uso del hecho de que los anticuerpos son antígenos por sí mismo, y por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, se usan anticuerpos específicos de proteína para inmunizar a un animal, preferentemente a un ratón. Los esplenocitos de dicho animal se usan entonces para producir células de hibridoma, y se exploran las células de hibridoma para identificar clones que producen un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de proteína pueda bloquearse por el polipéptido. Dichos anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos para el anticuerpo específico de proteína y pueden usarse para inmunizar a un animal para inducir la formación de anticuerpos específicos de proteína adicionales.

Se apreciará que pueden usarse fragmentos Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. Dichos fragmentos se producen normalmente mediante escisión proteolítica, usando enzimas, tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Como alternativa, los fragmentos de unión a proteínas pueden producirse mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante o mediante química sintética.

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Dichos anticuerpos pueden producirse usando construcciones genéticas derivadas de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos. (Véase, para una revisión, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly et al., la patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Taniguchi et al., el documento EP 171496; Morrison et al., el documento EP 173494; Neuberger et al., el documento WO 8601533; Robinson et al., el documento WO 8702671; Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Neuberger et al., Nature 314:268 (1985)).

Además, en otro método preferido, los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención pueden producirse en plantas. Se divulgan métodos específicos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.959.177 y 6.080.560. Los métodos no solo describen métodos para expresar anticuerpos, sino también los medios para ensamblar proteínas multiméricas exógenas en plantas (es decir, anticuerpos, etc.), y la posterior secreción de dichos anticuerpos por la planta.

EJEMPLO 16 - REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE AGREGACIÓN CONTROLADA EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Tal como se describe más particularmente en el presente documento, las proteínas regulan diversos procesos celulares en organismos superiores, que van desde cambios metabólicos rápidos hasta el crecimiento y diferenciación. La producción aumentada de proteínas específicas podría usarse para evitar determinadas enfermedades y/o patologías. Por lo tanto, la capacidad para modular la expresión de proteínas específicas en un organismo proporcionará beneficios significativos.

Se han desarrollado hasta la fecha numerosos métodos para la introducción de genes exógenos, bien bajo el control de un promotor inducible, constitutivamente activo o endógeno, en organismos. Son particularmente interesantes los promotores inducibles (véase, M. Gossen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89:5547 (1992); Y. Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:8180 (1994), D. No., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346 (1996); y V.M. Rivera, et al., Nature Med, 2:1028 (1996); además de ejemplos adicionales divulgados en otras partes del presente documento). En un ejemplo, el gen para eritropoyetina (Epo) se transfirió a ratones y primates bajo el control para su expresión de un inductor de molécula pequeña (por ejemplo, tetraciclina o rapamicina) (véase, D. Bohl, et al., Blood, 92:1512, (1998); K.G. Rendahl, et al., Nat. Biotech, 16:757, (1998); V.M. Rivera, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:8657 (1999); y X.Ye et al., Science, 283:88 (1999). Aunque dichos sistemas permiten la inducción eficaz del gen de interés en el organismo tras la adición del agente inductor (es decir, tetraciclina, rapamicina, etc.), los niveles de expresión tienden a alcanzar un pico a las 24 horas y vuelven a los niveles de fondo después de 4 a 14 días. Por lo tanto, la expresión transitoria controlada es virtualmente imposible usando estos sistemas, aunque podría ser deseable su control.

Se ha descubierto recientemente un método para controlar los niveles de expresión génica de un transgén (es decir, incluye transformantes estables y transitorios) (V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830 (2000)). Este método no controla la expresión génica a nivel del ARNm como los sistemas anteriormente mencionados. En cambio, el sistema controla el nivel de proteína en forma activa secretada. En ausencia del agente inductor, la proteína se agrega en el RE y no se secreta. Sin embargo, la adición del agente inductor da como resultado la desagregación de la proteína y la posterior secreción del RE. Dicho sistema permite una secreción basal baja, la secreción rápida de alto nivel en presencia del agente inductor, y el fin rápido de la secreción tras la retirada del agente inductor. De hecho, la secreción de proteínas alcanzó un nivel máximo a los 30 minutos de la inducción, y un fin rápido de la secreción a la hora de retirar el agente inductor. El método también es aplicable para controlar el nivel de producción para proteínas de membrana.

Se presentan métodos detallados en V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830, (2000)), en resumen:

Se crean construcciones de proteína de fusión usando secuencias polinucleotídicas de la presente invención con una o más copias (preferentemente al menos 2, 3, 4, o más) de un dominio de agregación condicional (CAD), un dominio que interactúa consigo mismo de una manera reversible por ligando (es decir, en presencia de un agente inductor) usando métodos de biología molecular conocidos en la técnica y discutidos en otras partes del presente documento. El dominio CAD puede ser el dominio mutante aislado de la proteína FKBP12 (Phe³⁶ a Met) humana (tal como se divulga en V.M. Rivera., et al., Science, 287:826-830, (2000), o como alternativa otras proteínas que tienen dominios con propiedades de autoagregación reversibles por ligando similares. Como principio de diseño, el vector de proteína de fusión podría contener una secuencia de escisión de furina unida operativamente entre los polinucleótidos de la presente invención y los dominios CAD. Dicho sitio de escisión podría permitir la escisión proteolítica de los dominios CAD del polipéptido de la presente invención después de la secreción desde el RE y tras la entrada en el trans-Golgi (J.B. Denault, et al., FEBS Lett., 379:113, (1996)). Como alternativa, el experto en la materia reconocerá que podría

sustituirse cualquier secuencia de escisión proteolítica por la secuencia de furina siempre que la secuencia sustituida sea escindible bien de manera endógena (por ejemplo, la secuencia de furina) o de manera exógena (por ejemplo, después de la secreción, después de la purificación, después de la producción, etc.). La secuencia preferida de cada característica de la construcción de proteína de fusión, en la dirección de 5' a 3' estando cada característica unida operativamente a la siguiente, sería un promotor, secuencia de señal, "X" número de dominios (CAD)x, la secuencia de furina (u otra secuencia proteolítica), y la secuencia codificante del polipéptido de la presente invención. El experto apreciará que el promotor y la secuencia de señal, independientes entre sí, pueden ser bien el promotor endógeno o la secuencia de señal de un polipéptido de la presente invención, o como alternativa, podrían ser una secuencia de señal y un promotor heterólogos.

Los métodos específicos descritos en el presente documento para controlar los niveles de secreción de proteínas mediante agregación controlada en el RE no pretenden ser limitantes y deben ser aplicables generalmente a cualquiera de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención, incluyendo variantes, homólogos, ortólogos, y fragmentos de estos.

EJEMPLO 17 - ALTERACIÓN DE LOS SITIOS DE GLUCOSILACIÓN DE PROTEÍNAS PARA POTENCIAR CARACTERÍSTICAS DE LOS POLIPÉPTIDOS DE LA INVENCION

Muchas superficies celulares eucariotas y proteínas se procesan postraduccionalmente para incorporar hidratos de carbono unidos a N o unidos a O (Kornfeld y Kornfeld (1985) Annu. Rev. Biochem. 54:631-64; Rademacher et al., (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:785-838). Se cree que la glucosilación de proteínas cumple diversas funciones que incluyen: aumento del plegamiento de proteínas, inhibición de la agregación de proteínas, regulación del tráfico intracelular a orgánulos, aumento de la resistencia a la proteólisis, modulación de la antigenicidad de proteínas, y mediación de la adhesión intercelular (Fieldler y Simons (1995) Cell, 81:309-312; Helenius (1994) Mol. Biol. Of the Cell 5:253-265; Olden et al., (1978) Cell, 13:461-473; Caton et al., (1982) Cell, 37:417-427; Alexamnder y Elder (1984), Science, 226:1328-1330; y Flack et al., (1994), J. Biol. Chem., 269:14015-14020). En organismos superiores, la naturaleza y el alcance de la glucosilación puede afectar de manera notable a la semivida en circulación y a la biodisponibilidad de las proteínas mediante mecanismos que implican la captación y eliminación mediada por receptor (Ashwell y Morrell, (1974), Adv. Enzymol., 41:99-128; Ashwell y Harford (1982), Ann. Rev. Biochem., 51:531-54). Se han identificado sistemas de receptor que se cree que juegan un papel importante en la eliminación de proteínas séricas mediante el reconocimiento de diversas estructuras de carbohidratos en las glucoproteínas (Stockert (1995), Physiol. Rev., 75:591-609; Kery et al., (1992), Arch. Biochem. Biophys., 298:49-55). Por lo tanto, las estrategias de producción que dan como resultado la unión incompleta de restos de ácido siálico terminales podrían proporcionar un medio para reducir la biodisponibilidad y semivida de las glucoproteínas. Por el contrario, las estrategias de expresión que dan como resultado una saturación de los sitios de unión de ácido siálico terminal pueden alargar la biodisponibilidad y semivida de las proteínas.

En el desarrollo de glucoproteínas recombinantes para su uso como productos farmacéuticos, por ejemplo, se ha especulado con que la farmacodinámica de las proteínas recombinantes pueda modularse mediante la adición o eliminación de sitios de glucosilación de la estructura primaria de una glucoproteína (Berman y lasky (1985a) Trends in Biotechnol., 3:51-53). Sin embargo, los estudios han comunicado que la eliminación de sitios de glucosilación unidos a N a menudo alteran el transporte intracelular y da como resultado la acumulación intracelular de variantes de sitio de glucosilación (Machamer y Rose (1988), J. Biol. Chem., 263:5955-5960; Gallagher et al., (1992), J. Virology., 66:7136-7145; Collier et al., (1993), Biochem., 32:7818-7823; Claffey et al., (1995) Biochemica et Biophysica Acta, 1246:1-9; Dube et al., (1988), J. Biol. Chem. 263:17516-17521). Aunque pueden expresarse intracelularmente variantes de sitios de glucosilación de proteínas, se ha demostrado que es difícil recuperar cantidades útiles de medio de cultivo celular condicionado para crecimiento.

Además, no está claro hasta qué punto el sitio de glucosilación en una especie se reconocerá por la maquinaria de glucosilación de otra especie. Debido a la importancia de la glucosilación en el metabolismo de proteínas, particularmente en la secreción y/o expresión de la proteína, si una señal de glucosilación se reconoce puede determinar profundamente la capacidad de una proteína para expresarse, ya sea de manera endógena o recombinantemente, en otro organismo (es decir, expresando una proteína humana en *E.coli*, levaduras, u organismos virales; o una proteína de *E. coli*, de levadura o viral en humanos, etc.). Por lo tanto, puede ser deseable añadir, eliminar, o modificar un sitio de glucosilación, y posiblemente añadir un sitio de glucosilación de una especie a una proteína de otra especie para mejorar las características funcionales, de bioproceso de purificación, y/o estructurales de la proteína (por ejemplo, un polipéptido de la presente invención).

Puede emplearse una serie de métodos para identificar la localización de los sitios de glucosilación en una proteína. Un método preferido es pasar la proteína traducida por el programa informático PROSITE (Swiss Institute of Bioinformatics). Una vez identificados, los sitios pueden eliminarse de manera sistemática, o alterarse, a nivel de ADN usando metodología de mutagénesis conocida en la técnica y disponible para el experto en la materia, preferentemente, usando mutagénesis dirigida mediante la PCR (Véase Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). De manera similar, los sitios de glucosilación pueden añadirse, o modificarse a nivel de ADN usando métodos similares, preferentemente métodos PCR (Véase, Maniatis, anteriormente citado). Los resultados de modificar los sitios de glucosilación para una proteína particular (por ejemplo,

solubilidad, potencial de secreción, actividad, agregación, resistencia a la proteólisis, etc.) podrían analizarse entonces usando métodos conocidos en la técnica.

El experto en la materia reconocerá la existencia de otros algoritmos informáticos capaces de predecir la localización de los sitios de glucosilación en una proteína. Por ejemplo, el programa informático Motif (grupo de programas Genetics Computer Group) proporciona también esta función.

EJEMPLO 18 - MÉTODO PARA POTENCIAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA/CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LA INVENCION MEDIANTE EVOLUCION MOLECULAR

Aunque muchas de la mayoría de proteínas biológicamente activas conocidas son elevadamente eficaces para su función específica en un organismo, a menudo poseen características que las hacen no deseadas para aplicaciones transgénicas, terapéuticas, y/o industriales. Entre estas características, una semivida fisiológica corta es el problema más importante, y está presente bien al nivel de la proteína, o al nivel del ARNm de la proteína. La capacidad para extender la semivida, por ejemplo, sería particularmente importante para el uso de una proteína en terapia génica, producción de animales transgénicos, el bioproceso de producción y la purificación de la proteína, y el uso de la proteína como modulador químico, entre otros. Por lo tanto, existe una necesidad para identificar nuevas variantes de proteínas aisladas que poseen características que potencian su aplicación como agente terapéutico para tratar enfermedades de origen animal, además de la aplicabilidad de las proteínas a aplicaciones industriales y farmacéuticas comunes.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a la capacidad para potenciar características específicas de la invención mediante evolución molecular dirigida. Dicho potenciamiento puede, en un ejemplo no limitante, beneficiar a la utilidad de la invención como componente esencial en un kit, los atributos físicos de la invención, tales como su solubilidad, estructura, u optimización de codones, la actividad biológica específica de la invención, incluyendo cualquier actividad enzimática asociada, la cinética enzimática de la proteína, la K_i , K_{cat} , K_m , V_{max} , K_d de la proteína, la actividad proteína-proteína, la actividad de unión proteína-ADN, la actividad antagonista/inhibidora (incluyendo interacción directa o indirecta), la actividad agonista (incluyendo interacción directa o indirecta), la antigenicidad de la proteína (por ejemplo, donde podría ser deseable bien aumentar o bien disminuir el potencial antigénico de la proteína), la inmunogenicidad de la proteína, la capacidad de la proteína para formar dímeros, trímeros, o multímeros bien consigo misma o con otras proteínas, la eficacia antigénica de la invención, incluyendo su uso posterior como tratamiento preventivo para enfermedades o patologías, o como un efector para dirigirse a genes enfermos. Además, la capacidad para potenciar características específicas de una proteína también puede ser aplicable a cambiar la actividad caracterizada de una enzima a una actividad completamente inconexa con su actividad inicialmente caracterizada. Otras mejoras deseables de la invención serían específicas para cada proteína individual, tal como se conoce bien en la técnica.

La evolución dirigida está compuesta de varias etapas. La primera etapa es establecer una biblioteca de variantes para el gen o proteína de interés. La etapa más importante es por lo tanto seleccionar aquellas variantes que conllevan la actividad que se quiere identificar. El diseño de la exploración es esencial ya que esta exploración debe ser lo suficientemente selectiva como para eliminar variantes no útiles, pero no tan rigurosa como para eliminar todas las variantes. La última etapa es por lo tanto repetir las etapas anteriores usando la mejor variante de la exploración previa. Cada ciclo sucesivo puede por lo tanto ajustarse según sea necesario, tal como aumentando la rigurosidad de la selección, por ejemplo.

A lo largo de los años se han desarrollado una serie de métodos para introducir mutaciones en macromoléculas. Algunos de estos métodos incluyen mutagénesis al azar, PCR propensa a errores, mutagénesis química, mutagénesis de sitio dirigido, y otros métodos bien conocidos en la técnica (para una lista exhaustiva de los métodos actuales de mutagénesis, véase Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982)). Normalmente, dichos métodos se han usado, por ejemplo, como herramientas para identificar las regiones funcionales principales de una proteína o la función de dominios específicos de una proteína (en el caso de una proteína multi-dominio). Sin embargo, dichos métodos se han aplicado más recientemente para la identificación de variantes de macromoléculas con características específicas o potenciadas.

La mutagénesis al azar ha sido el método más ampliamente reconocido hasta la fecha. Normalmente, esto se ha llevado a cabo bien mediante el uso de PCR "propensa a errores" (tal como se describe en Moore, J., et al, Nature Biotechnology 14:458, (1996), o mediante la aplicación de oligonucleótidos sintéticos aleatorizados correspondientes a regiones de interés específicas (tal como se describe por Derbyshire, K.M. et al, Gene, 46:145-152, (1986), y Hill, DE, et al, Methods Enzymol., 55:559-568, (1987). Ambas estrategias tienen limitaciones en el nivel de mutagénesis que puede obtenerse. Sin embargo, cualquier estrategia permite al investigador controlar de manera eficaz la tasa de mutagénesis. Esto es particularmente importante teniendo en consideración el hecho de que las mutaciones beneficiosas para la actividad de la proteína son bastante raras. De hecho, usando un nivel de mutagénesis demasiado alto puede contrarrestar o inhibir el beneficio deseado de una mutación útil.

Aunque ambos métodos anteriormente mencionados son eficaces para crear grupos aleatorizados de variantes de macromoléculas, un tercer método, denominado "reordenamiento de ADN", o "PCR sexual" (WPC, Stemmer, PNAS,

91:10747, (1994)) se ha descubierto recientemente. El reordenamiento de ADN también se ha citado como "evolución molecular dirigida", "reordenamiento de exones", "evolución enzimática dirigida", "evolución *in vitro*", y "evolución artificial". Dichos términos de referencia se conocen en la técnica. Este método nuevo preferido aparentemente supera las limitaciones de los métodos anteriores en tanto que no solo propaga rasgos positivos, sino que elimina simultáneamente rasgos negativos en la descendencia resultante.

El reordenamiento de ADN cumple esta tarea combinando los principios de la recombinación *in vitro*, con el método de la PCR "propensa a errores". De hecho, se comienza con un grupo digerido al azar de pequeños fragmentos de un gen, creado mediante digestión con DNasa I, y después se introducen dichos fragmentos aleatorios en una reacción de montaje de PCR "propensa a errores". Durante la reacción de la PCR, los fragmentos de ADN de tamaño aleatorio no solo hibridan con su hebra afín, sino que también pueden hibridar con otros fragmentos de ADN correspondientes a diferentes regiones del polinucleótido de interés, regiones que no están normalmente accesibles mediante hibridación del polinucleótido completo. Además, ya que la reacción de montaje mediante la PCR utiliza condiciones de reacción de PCR "propensa a errores", se introducen mutaciones al azar durante la etapa de síntesis de ADN de la reacción de la PCR para todos los fragmentos, diversificando adicionalmente los sitios potenciales de hibridación durante la etapa de hibridación de la reacción.

Pueden utilizarse diversas condiciones de reacción para llevar a cabo la reacción de reordenamiento de ADN. Sin embargo, las condiciones de reacción específicas para el reordenamiento de ADN se proporcionan, por ejemplo, en PNAS, 91:10747, (1994). En resumen:

Se prepara el sustrato de ADN para someterse a la reacción de reordenamiento de ADN. La preparación puede ser en forma simplemente de purificación del ADN de material celular contaminante, agentes químicos, tampones, cebadores oligonucleotídicos, desoxinucleótidos, ARN, etc., y puede conllevar el uso de kits de purificación de ADN, tales como aquellos proporcionados por Qiagen, Inc., o por Promega, Corp., por ejemplo.

Una vez que se ha purificado el sustrato de ADN, puede someterse a digestión mediante DNasa I. Se digerirán aproximadamente 2-4 µg del sustrato o sustratos de ADN con 0,0015 unidades de DNasa I (Sigma) por µl en 100 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4/MgCl₂ 1 mM durante 10-20 min a temperatura ambiente. Los fragmentos resultantes de 10-50 pb podrían purificarse pasándolos mediante electroforesis a través de un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2 % sobre papel de intercambio iónico DE81 (Whatmann) o podría purificarse usando concentradores MICROCON® (Amicon) del valor de corte de peso molecular adecuado, o podrían usarse columnas de purificación de oligonucleótidos (Qiagen), además de otros métodos conocidos en la técnica. En caso de usar papel de intercambio iónico DE81, los fragmentos de 10-50 pb podrían eluirse de dicho papel usando NaCl 1M, seguido de precipitación en etanol.

Los fragmentos purificados resultantes podrían someterse entonces a una reacción de montaje mediante la PCR mediante resuspensión en una mezcla PCR que contiene: 2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2,2 mM, KCl 50 mM, Tris•HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1 %, a una concentración final de fragmento de 10-30 ng/µl. No se añaden cebadores en este punto. Podría usarse ADN polimerasa Taq (Promega) a 2,5 unidades por 100 µl de mezcla de reacción. Se usa un programa para la PCR de 94 °C durante 60 s; 94 °C durante 30 s, 50-55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s usando 30-45 ciclos, seguido de 72 °C durante 5 min usando un termociclador PTC-150 de MJ RESEARCH® (Cambridge, MA). Después de completar la reacción de montaje, podría introducirse una dilución a 1:40 del producto sin cebador resultante en una mezcla de PCR (usando la misma mezcla de tampón usada para la reacción de montaje) que contiene 0,8 µM de cada cebador y sometiendo a esta mezcla a 15 ciclos de PCR (usando 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s). Los cebadores citados podrían ser cebadores correspondientes a las secuencias de ácido nucleico del polinucleótido o polinucleótidos utilizados en la reacción de reordenamiento. Dichos cebadores pueden consistir en pares de bases de ácido nucleico modificadas usando métodos conocidos en la técnica y citados en otras partes del presente documento, o pueden contener secuencias adicionales (es decir, para añadir sitios de restricción, mutar pares de bases específicos, etc.).

El producto reordenado, ensamblado y amplificado resultante puede purificarse usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo kits de purificación de PCR de Qiagen) y después clonarse a continuación usando enzimas de restricción adecuadas.

Aunque se han publicado una serie de variaciones de reordenamiento de ADN hasta la fecha, dichas variaciones serán obvias para el experto en la materia. El método de reordenamiento de ADN también puede ajustarse al nivel deseado de mutagénesis usando los métodos descritos por Zhao, et al., (Nucl Acid Res., 25(6):1307-1308, (1997).

Tal como se ha descrito anteriormente, una vez que se ha creado el grupo aleatorizado, puede someterse a una exploración específica para identificar la variante que posee la característica o las características deseadas. Una vez que se ha identificado la variante, puede usarse el ADN correspondiente a la variante como sustrato de ADN para iniciar otro ciclo de reordenamiento de ADN. Este ciclo de reordenamiento, selección de la variante de interés optimizada, y después reordenar de nuevo, puede repetirse hasta que se crea la última variante. Los ejemplos de exploraciones de modelo aplicadas para identificar variantes creadas usando tecnología de reordenamiento de ADN pueden encontrarse en las siguientes publicaciones: J. C., Moore, et al., J. Mol. Biol., 272:336-347, (1997), F.R., Cross,

et al., Mol. Cell. Biol., 18:2923-2931, (1998), y A. Crameri., et al., Nat. Biotech., 15:436-438, (1997).

El reordenamiento de ADN tiene varias ventajas. Primeramente, hace uso de mutaciones beneficiosas. Cuando se combina con exploración, el reordenamiento de ADN permite el descubrimiento de las mejores combinaciones mutacionales y no asume que la mejor combinación contenga todas las mutaciones en una población. En segundo lugar, la recombinación sucede simultáneamente con mutagénesis puntual. Un efecto de forzar a que la ADN polimerasa sintetice genes de longitud completa a partir del grupo de ADN de fragmentos pequeños es la tasa de mutagénesis de fondo. En combinación con un método de selección riguroso, se ha evolucionado la actividad enzimática hasta un aumento de 16000 veces frente a la forma de tipo silvestre de la enzima. En esencia, la mutagénesis de fondo originó la variabilidad genética sobre la que actuó la recombinación para potenciar la actividad.

Una tercera característica de la recombinación es que puede usarse para eliminar mutaciones perjudiciales. Como ya se ha discutido anteriormente, durante el proceso de aleatorización, para cada mutación beneficiosa puede haber al menos una o más mutaciones neutras o inhibitorias. Dichas mutaciones pueden eliminarse incluyendo en la reacción de montaje un exceso de los fragmentos de tamaño al azar de tipo silvestre, además de los fragmentos de tamaño al azar del mutante seleccionado a partir de la selección anterior. Durante la selección siguiente, algunas de las variantes más activas del polinucleótido/polipéptido/enzima deberían haber perdido las mutaciones inhibitorias.

Finalmente, la recombinación permite el procesamiento en paralelo. Esto representa una ventaja significativa ya que hay probablemente múltiples características que podrían hacer más deseable a una proteína (por ejemplo, solubilidad, actividad, etc.). Ya que cada vez es más difícil explorar más de un rasgo deseable a la vez, otros métodos de evolución molecular tienden a ser inhibitorios. Sin embargo, usando recombinación, podría ser posible combinar los fragmentos aleatorizados de las mejores variantes representativas para los diversos rasgos, y después seleccionar múltiples propiedades a la vez.

El reordenamiento de ADN también puede aplicarse a los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención para disminuir su inmunogenicidad en un hospedador especificado. Por ejemplo, una variante particular de los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención puede crearse y aislarse utilizando tecnología de reordenamiento de ADN. Dicha variante puede tener todas las características deseadas, aunque puede ser elevadamente inmunogénica en un hospedador debido a su nueva estructura intrínseca. Específicamente, la característica deseada puede hacer que el polipéptido tenga una estructura no nativa que no pueda reconocerse ya como molécula "propia", sino como "exógena", y por lo tanto activar una respuesta inmune del hospedador dirigida contra la nueva variante. Dicha limitación puede superarse, por ejemplo, incluyendo una copia de la secuencia génica para un ortólogo xenobiótico de la proteína nativa en la secuencia génica del nuevo gen variante en uno o más ciclos de reordenamiento de ADN. Por consiguiente, la relación molar de los ADN del ortólogo y de la nueva variante puede variarse. Idealmente, la variante híbrida resultante identificada podría contener al menos parte de la secuencia codificante que permitió que la proteína xenobiótica escapase del sistema inmune del hospedador, y además, la secuencia codificante de la nueva variante original que proporcionó las características deseadas.

Del mismo modo, en el presente documento se describe la aplicación de tecnología de reordenamiento de ADN a la evolución de polinucleótidos y polipéptidos de la invención, en la que uno o más ciclos de reordenamiento de ADN incluyen, además del ADN molde del gen, oligonucleótidos que codifican secuencias alélicas, secuencias de codones optimizadas, secuencias variantes conocidas, secuencias de polimorfismos de polinucleótidos conocidas, secuencias de ortólogos conocidas, secuencias de homólogos conocidas, secuencias de homólogos adicionales, secuencias de no homólogos adicionales, secuencias procedentes de otra especie, y cualquier número y combinación de los anteriores.

Además de los métodos descritos anteriormente, hay una serie de métodos relacionados que también pueden ser aplicables, o deseables en determinados casos. Entre estos, son representativos los métodos descritos en las solicitudes PCT WO 98/31700, y WO 98/32845. Además, también pueden aplicarse métodos relacionados a las secuencias polinucleotídicas de la presente invención para evolucionar la invención para crear variantes idénticas para su uso en terapia génica, diseño de proteínas, evolución de células completas que contienen la variante, o en la evolución de rutas enzimáticas completas que contienen polinucleótidos de la presente invención, tal como se describe en las solicitudes PCT WO 98/13485, WO 98/13487, WO 98/27230, WO 98/31837, y Crameri, A., et al., Nat. Biotech., 15:436-438, (1997), respectivamente.

Los métodos adicionales para aplicar tecnología de "reordenamiento de ADN" a los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención, incluyendo sus aplicaciones propuestas, pueden encontrarse en la Patente de Estados Unidos Nº 5.605.793; la solicitud PCT Nº WO 95/22625; la solicitud PCT Nº WO 97/20078; la solicitud PCT Nº WO 97/35966; y la solicitud PCT Nº WO 98/42832; la solicitud PCT Nº WO 00/09727 proporciona específicamente métodos para aplicar reordenamiento de ADN a la identificación de cultivos selectivos para herbicida que podrían aplicarse a los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención; además, la solicitud PCT Nº WO 00/12680 proporciona métodos y composiciones para generar, modificar, adaptar, y optimizar secuencias polinucleotídicas que confieren propiedades fenotípicas detectables en especies de plantas.

EJEMPLO 19 - MÉTODO PARA DETERMINAR ALTERACIONES EN UN GEN QUE CORRESPONDE A UN POLINUCLEÓTIDO

Se aísla el ARN de familias enteras o de pacientes individuales que presentan un fenotipo de interés (tal como una enfermedad). Entonces se genera ADNc a partir de estas muestras de ARN usando protocolos conocidos en la técnica. (Véase, Sambrook). Después se usa el ADNc como molde para la PCR empleando cebadores que rodean a las regiones de interés en SEC ID N°: 1. Las condiciones de la PCR sugeridas consisten en 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos; 60-120 segundos a 52-58 °C; y 60-120 segundos a 70 °C, usando soluciones de tampón descritas en Sidransky et al., Science 252:706 (1991).

Después se secuencian los productos de la PCR usando cebadores marcados en su extremo 5' con polinucleótido cinasa T4, empleando polimerasa SequiTherm. (Epicentre Technologies). Los límites de intrón-exón de los exones seleccionados también se determinan y los productos genómicos de la PCR se analizan para confirmar los resultados. Los productos de la PCR que se sospecha que portan mutaciones se clonan y secuencian posteriormente para validar los resultados de la secuenciación directa.

Los productos de la PCR se clonan en vectores con cola de T tal como se describe en Holton et al., Nucleic Acids Research, 19:1156 (1991) y se secuencian con polimerasa T7 (United States Biochemical). Los individuos afectados se identifican por mutaciones no presentes en individuos no afectados.

También se observan los reordenamientos genómicos como método para determinar alteraciones en un gen que corresponde a un polinucleótido. Los clones genómicos aislados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se someten a traslación de muescas con digoxigenina desoxiuridina 5'-trifosfato (Boehringer Mannheim), y se lleva a cabo FISH tal como se describe en Johnson et al., Methods Cell Biol. 35:73-99 (1991). La hibridación con la sonda marcada se lleva a cabo usando un gran exceso de ADN de cot-1 humano para la hibridación específica al correspondiente locus genómico.

Se contratiñen los cromosomas con 4,6-diamino-2-fenilidol y yoduro de propidio, produciendo una combinación de bandas C y R. Se obtienen imágenes alineadas para un mapeo preciso usando un conjunto de filtros de triple banda (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en combinación con un dispositivo de cámara acoplado a una carga enfriada (Photometrics, Tucson, AZ) y filtros de longitud de onda de excitación variable. (Johnson et al., Genet. Anal. Tech. Appl., 8:75 (1991)). La recogida de imágenes, el análisis y las mediciones de longitud fraccional cromosómica se llevan a cabo usando el sistema de programa gráfico ISEE®. (Inovision Corporation, Durham, NC). Las alteraciones cromosómicas de la región genómica hibridada mediante la sonda se identifican como inserciones, deleciones, y traslocaciones. Estas alteraciones se usan como marcador diagnóstico para una enfermedad asociada.

EJEMPLO 20 - MÉTODO PARA DETECTAR NIVELES ANORMALES DE UN POLIPÉPTIDO EN UNA MUESTRA BIOLÓGICA

Un polipéptido de la presente invención puede detectarse en una muestra biológica, y si se detecta un nivel aumentado o disminuido del polipéptido, este polipéptido es un marcador para un fenotipo particular. Los métodos de detección son numerosos, y por lo tanto, se entiende que un experto en la materia puede modificar el siguiente ensayo para ajustarse a sus necesidades particulares.

Por ejemplo, se usan ELISA sándwich de anticuerpos para detectar polipéptidos en una muestra, preferentemente una muestra biológica. Se recubren los pocillos de una placa de microtitulación con anticuerpos específicos, a una concentración de 0,2 a 10 µg/ml. Los anticuerpos son bien monoclonales o bien policlonales y se producen mediante el método descrito en otras partes del presente documento. Los pocillos se bloquean de tal forma que se reduce la unión no específica del polipéptido al pocillo.

Los pocillos recubiertos se incuban entonces durante > de 2 horas a TA con una muestra que contiene el polipéptido. Preferentemente, deben usarse diluciones en serie de la muestra para validar los resultados. Después se lavan las placas tres veces con agua destilada desionizada para eliminar el polipéptido no unido.

A continuación, se añaden 50 µl de conjugado anticuerpo específico-fosfatasa alcalina, a una concentración de 25-400 ng, y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan de nuevo tres veces con agua destilada desionizada para eliminar el conjugado no unido.

Se añaden 75 µl de solución de sustrato de 4-metilumbeliferil fosfato (MUP) o p-nitrofenil fosfato (NPP) a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mide la reacción con un lector de placas de microtitulación. Se elabora una curva patrón usando diluciones en serie de una muestra de control, y se representa la concentración de polipéptido en el eje X (escala logarítmica) y la fluorescencia o la absorbancia en el eje Y (escala lineal). La concentración del polipéptido en la muestra se interpola usando la curva patrón.

EJEMPLO 21 - MÉTODO PARA AISLAR FRAGMENTOS DE ANTICUERPO DIRIGIDOS CONTRA PCSK9b O PCSK9c A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA DE scFv

Los genes V de origen natural aislados de PBL humanos se construyen en una biblioteca de fragmentos de anticuerpo que contienen reactividades contra PCSK9b o PCSK9c a los que el donante puede o no haber estado expuesto (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.885.793).

Rescate de la biblioteca. Se construye una biblioteca de scFv a partir del ARN de PBL tal como se describe en la Publicación PCT WO 92/01047. Para rescatar el fago que muestra fragmentos de anticuerpo, se usan aproximadamente 109 *E. coli* que portan el fagémido para inocular 50 ml de 2xTY que contiene glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina (2xTY-AMP-GLU) y se crecen hasta una D.O. de 0,8 con agitación. Se usan cinco ml de este cultivo para inocular 50 ml de 2xTY-AMP-GLU, se añaden 2 x 10⁸ TU colaborador de gen 3 delta (gen III M13 delta, véase la Publicación PCT WO 92/01047) y se incuba el cultivo a 37 °C durante 45 minutos sin agitación y después a 37 °C durante 45 minutos con agitación. El cultivo se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 min y después se resuspende el precipitado en 2 litros de 2xTY que contiene 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina y se crece durante toda una noche. Los fagos se preparan tal como se describe en la publicación PCT WO 92/01047.

El gen III M13 delta se prepara del modo siguiente: El fago colaborador de gen III M13 delta no codifica proteína de gen III, por lo tanto el fago (o fagémido) que muestra fragmentos de anticuerpo tiene una mayor avidez por la unión al antígeno. Las partículas infecciosas de gen III M13 delta se elaboran creciendo el fago colaborador en células que portan un derivado de pUC19 que suministra la proteína del gen III durante la morfogénesis del fago. El cultivo se incuba durante 1 hora a 37 °C sin agitación y después durante una hora adicional a 37 °C con agitación. Las células se precipitan por centrifugación (IEC-Centra 8.400 r.p.m. durante 10 min), se resuspenden en 300 ml de caldo 2xTY que contiene 100 µg de ampicilina/ml y 25 µg de kanamicina/ml (2xTY-AMP-KAN) y se crecen durante toda una noche, con agitación a 37 °C. Las partículas de fago se purifican y concentran a partir del medio de cultivo mediante dos precipitaciones con PEG (Sambrook et al., 1990), se resuspenden en 2 ml de PBS y se hacen pasar a través de un filtro de 0,45 µm (Minisart NML; Sartorius) para dar una concentración de aproximadamente 1013 unidades transductoras/ml (clones resistentes a ampicilina).

Paneo de la biblioteca. Se recubren Immunotubes (Nunc) durante toda la noche en PBS con 4 ml de 100 µg/ml o 10 µg/ml de un polipéptido de la presente invención. Los tubos se bloquean con Marvel-PBS al 2 % durante 2 horas a 37 °C y después se lavan 3 veces en PBS. Se aplican aproximadamente 1013 TU de fago al tubo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente volteando hacia arriba y hacia abajo y después se deja reposar durante 1,5 horas adicionales. Los tubos se lavan 10 veces con PBS, Tween-20 al 0,1 % y 10 veces con PBS. Los fagos se eluyen añadiendo 1 ml de trietilamina 100 mM y rotando por inversión durante 15 minutos, tras los cuales se neutralizan inmediatamente con 0,5 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,4. Después se usan los fagos para infectar 10 ml de TG1 de *E. coli* de longitud media incubando los fagos eluidos con bacterias durante 30 minutos a 37 °C. Después se siembran las *E. coli* en placas TYE que contienen glucosa al 1 % y 100 µg/ml de ampicilina. La biblioteca bacteriana resultante se rescata después con fago colaborador de gen 3 delta tal como se describe anteriormente para preparar fagos para una ronda posterior de selección. Este proceso se repite entonces hasta un total de 4 rondas de purificación de afinidad con lavado del tubo aumentado hasta 20 veces con PBS, Tween-20 al 0,1 % y 20 veces con PBS para las rondas 3 y 4.

Caracterización de fagos de unión. Los fagos eluidos de las rondas 3ª y 4ª de selección se usan para infectar *E. coli* HB 2151 y se producen scFv solubles (Marks, et al., 1991) a partir de colonias individuales para ensayo. Los ELISA se llevan a cabo con placas de microtitulación recubiertas con 10 pg/ml del polipéptido de la presente invención en bicarbonato 50 mM, pH 9,6. Los clones positivos en el ELISA se caracterizan adicionalmente mediante toma de huellas por PCR (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 92/01047) y después mediante secuenciación. Estos clones positivos a ELISA pueden caracterizarse adicionalmente también mediante técnicas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, mapeo de epítomos, afinidad de unión, transducción de señal de receptor, capacidad para bloquear o inhibir de manera competitiva la unión anticuerpo/antígeno, y actividad agonista o antagonista competitiva.

Además, en otro método preferido, los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención pueden producirse en plantas. Se divulgan métodos específicos en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.959.177 y 6.080.560. Los métodos no solo describen métodos para expresar anticuerpos, sino también los medios para ensamblar proteínas multiméricas exógenas en plantas (es decir, anticuerpos, etc.), y la posterior secreción de dichos anticuerpos por la planta.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bristol-Myers Squibb Company
- <120> POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN NUEVAS VARIANTES DE PCSK9
- <130> 10836 PCT
- <150> US 60/818.234

<151> 30-06-2006

<160> 40

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 3175

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (250)..(1194)

15

<400> 1

gatgacttgg gtccttcttg gcagtagcat tgccagctga tggccttgga cagttacctg	60
ccctctctag gcctcccttt ccttgtctat gaaatacatt atagaatagg atgtagtgtg	120
tgaggatttt ttggagggtta aacgagtgaa tatatttaag ggcctttcac cagtgcctgg	180
gatgtgctct gtagtttctg tgtgttaact ataaggttga ctttatgctc attccctcct	240
ctcccacaa atg tcg cct tgg aaa gac gga ggc agc ctg gtg gag gtg tat	291
Met Ser Pro Trp Lys Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr	
1 5 10	
ctc cta gac acc agc ata cag agt gac cac cgg gaa atc gag ggc agg	339
Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg	
15 20 25 30	
gtc atg gtc acc gac ttc gag aat gtg ccc gag gag gac ggg acc cgc	387
Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg	
35 40 45	
ttc cac aga cag gcc agc aag tgt gac agt cat ggc acc cac ctg gca	435
Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala	
50 55 60	
gga gtg gtc agc ggc cgg gat gcc ggc gtg gcc aag ggt gcc agc atg	483
Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met	
65 70 75	
cgc agc ctg cgc gtg ctc aac tgc caa ggg aag ggc acg gtt agc ggc	531
Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly	
80 85 90	

acc ctc ata ggc ctg gag ttt att cgg aaa agc cag ctg gtc cag cct	579
Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro	
95 100 105 110	
gtg ggg cca ctg gtg gtg ctg ctg ccc ctg gcg ggt ggg tac agc cgc	627
Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg	
115 120 125	
gtc ctc aac gcc gcc tgc cag cgc ctg gcg agg gct ggg gtc gtg ctg	675
Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu	
130 135 140	
gtc acc gct gcc ggc aac ttc cgg gac gat gcc tgc ctc tac tcc cca	723
Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro	
145 150 155	
gcc tca gct ccc gag gtc atc aca gtt ggg gcc acc aat gcc cag gac	771
Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp	
160 165 170	
cag ccg gtg acc ctg ggg act ttg ggg acc aac ttt ggc cgc tgt gtg	819
Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val	
175 180 185 190	
gac ctc ttt gcc cca ggg gag gac atc att ggt gcc tcc agc gac tgc	867
Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys	
195 200 205	
agc acc tgc ttt gtg tca cag agt ggg aca tca cag gct gct gcc cac	915
Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His	
210 215 220	
gtg gct ggc att gca gcc atg atg ctg tct gcc gag ccg gag ctc acc	963
Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr	
225 230 235	
ctg gcc gag ttg agg cag aga ctg atc cac ttc tct gcc aaa gat gtc	1011
Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val	
240 245 250	
atc aat gag gcc tgg ttc cct gag gac cag cgg gta ctg acc ccc aac	1059
Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn	
255 260 265 270	
ctg gtg gcc gcc ctg ccc ccc agc acc cat ggg gca ggc cct ttt tgc	1107
Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Pro Phe Cys	
275 280 285	
agg ttg gca gct gtt ttg cag gac tgt gtg gtc agc aca ctc ggg gcc	1155
Arg Leu Ala Ala Val Leu Gln Asp Cys Val Val Ser Thr Leu Gly Ala	
290 295 300	
tac acg gat ggc cac agc cat cgc ccg ctg cgc ccc aga tgaggagctg	1204
Tyr Thr Asp Gly His Ser His Arg Pro Leu Arg Pro Arg	
305 310 315	

ctgagctgct	ccagtttctc	caggagtggt	aagcggcggg	gcgagcgcat	ggaggcccaa	1264
gggggcaagc	tggctctgcg	ggcccaacaac	gcttttggtg	gtgaggggtg	ctacgccatt	1324
gccaggtgct	gcctgctacc	ccaggccaac	tgcagcgtec	acacagctcc	accagctgag	1384
gccagcatgg	ggaccctgtg	ccactgccac	caacagggcc	acgtctctac	aggctgcagc	1444
tccactggg	agggtggagga	ccttggcacc	cacaagccgc	ctgtgctgag	gccacgaggt	1504
cagcccaacc	agtgcgtggg	ccacagggag	gccagcatcc	acgttctctg	ctgccatgcc	1564
ccaggtctgg	aatgcaaagt	caaggagcat	ggaatcccg	cccctcagga	gcaggtgacc	1624
gtggcctgcg	aggagggctg	gaccctgact	ggctgcagtg	ccctccctgg	gacctccac	1684
gtcttggggg	cctacgccgt	agacaacacg	tgtgtagtca	ggagccggga	cgtcagcact	1744
acaggcagca	ccagcgaaga	ggccgtgaca	gccgttgcca	tctgctgccg	gagccggcac	1804
ctggcgcagg	cctcccagga	gctccagtga	cagccccatc	ccaggatggg	tgtctgggga	1864
gggtcaagg	ctggggctga	gctttaaaat	ggttccgact	tgtccctctc	tcagccctcc	1924
atggcctggc	acgaggggat	ggggatgctt	ccgcctttcc	ggggctgctg	gcctggccct	1984
tgagtggggc	agcctccttg	cctggaactc	actcactctg	ggcgccctct	ccccaggtgg	2044
agggtgccag	aagctccctc	cctcactgtg	gggcatttca	ccattcaaac	aggctcagct	2104
gtgctcgggt	gctgccagct	gctcccaatg	tgcgatgtc	cgtgggcaga	atgactttta	2164
ttgagctctt	gttccgtgcc	aggcattcaa	tctcaggtc	tccaccaagg	aggcaggatt	2224
cttcccatgg	ataggggagg	gggaggtagg	ggctgcaggg	acaaacatcg	ttgggggggtg	2284
agtgtgaaag	gtgctgatgg	ccctcatctc	cagctaactg	tggagaagcc	cctgggggct	2344
ccctgattaa	tggaggctta	gctttctgga	tggcatctag	ccagaggctg	gagacaggtg	2404
tgcccctggt	ggcacagggc	tgtgccttgg	tttctctgagc	cacctttact	ctgctctatg	2464
ccaggctgtg	ctagcaacac	ccaaagggtg	cctgccccga	gccatcacct	aggactgact	2524
cggcagtggt	cagtgggtgca	tgcactgtct	cagccaaccc	gctccactac	ccggcagggt	2584
acacattcgc	acccctactt	cacagaggaa	gaaacctgga	accagagggg	gcgtgcctgc	2644
caagctcaca	cagcaggaa	tgagccagaa	acgcagattg	ggctggctct	gaagccaagc	2704
ctcttcttac	ttcacccggc	tgggctcctc	atcttttacgg	gtaacagtga	ggctgggaag	2764
gggaacacag	accaggaagc	tcggtgagtg	atggcagaa	gatgcctgca	ggcatggaac	2824
tttttccgtt	atcaccaggg	cctgattcac	tggcctggcg	gagatgcttc	taaggcatgg	2884
tcgggggaga	gggccaacaa	ctgtccctcc	ttgagcacca	gccccacca	agcaagcaga	2944
catttatctt	ttgggtctgt	cctctctgtt	gcctttttac	agccaacttt	tctagacctg	3004
ttttgctttt	gtaacttgaa	gatatttatt	ctgggttttg	tagcattttt	attaatatgg	3064
tgacttttta	aaataaaaaa	aaacaaacgt	tgtcctaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3124
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a	3175

<210> 2
<211> 315
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Met Ser Pro Trp Lys Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu
 1          5          10          15

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met
          20          25          30

Val Thr Asp Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His
          35          40          45

Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val
 50          55          60

Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser
 65          70          75          80

Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu
          85          90          95

Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly
          100          105          110

Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu
          115          120          125

Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr
          130          135          140

Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser
          145          150          155          160

```

Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro
165 170 175

Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu
180 185 190

Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr
195 200 205

Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala
210 215 220

Gly Ile Ala Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala
225 230 235 240

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

Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val
260 265 270

Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Pro Phe Cys Arg Leu
275 280 285

Ala Ala Val Leu Gln Asp Cys Val Val Ser Thr Leu Gly Ala Tyr Thr
290 295 300

Asp Gly His Ser His Arg Pro Leu Arg Pro Arg
305 310 315

<210> 3
<211> 3756
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (881)..(2449)

<400> 3

tgctagcagc aacctgcctg aagtcttcct ttggcctggc tgagagtttc tgagacctgc 60
gctggagcgg aggtgcttcc ttccttgctt cctttcttcc tctctccctt ctccatccag 120
caggctggac ctgcctggca tctgtgagct ctcctactt tctcctatac cctaaccttt 180

gtcctgcatg ggcgactccc ccagtgcgtc tcttgagctt tttaccccag tgccctgcttc	240
ttggagaatc caaactgatac cagttaggga tgataaagtg tagggtaggc gctcgggtgac	300
tgttttctct gaggttggtga ctctgtgtgag gcagaagcag tccccgtgag cccctcctggt	360
atcttggtga gtggagaacg cttggacctg gagccaggag gccagacat acatcctgtc	420
cgagctgcag ctctcctgtct ctaaaatgag ccggccagcg cagggtggcca gacatcactg	480
ttattctcct ttgagtcctt aaatcttggt gtctttcttg cagactcggg gagctgtgaa	540
aggctataat aggggcttta ttttacactt tgatactatt ttttgaacat tcatattatt	600
gttagatatt gatattcata tgaaggagca ggatgacttg ggtccttctt ggcagtagca	660
ttgccagctg atggccttgg acagttacct gccctctcta ggccctccctt tcttctgtcta	720
tgaatacat tatagaatag gatgtagtgt gtgaggattt tttggagggt aaacgagtga	780
atatatttaa ggcgctttca ccagtgcctg ggatgtgctc tgtagtttct gtgtgttaac	840
tataagggtg actttatgct cattccctcc tctcccacaa atg tgc cct tgg aaa	895
	Met Ser Pro Trp Lys
	1 5
gac gga ggc agc ctg gtg gag gtg tat ctc cta gac acc agc ata cag	943
Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln	
	10 15 20
agt gac cac cgg gaa atc gag ggc agg gtc atg gtc acc gac ttc gag	991
Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu	
	25 30 35
aat gtg ccc gag gag gac ggg acc cgc ttc cac aga cag gcc agc aag	1039
Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys	
	40 45 50
tgt gac agt cat ggc acc cac ctg gca ggg gtg gtc agc ggc cgg gat	1087
Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp	
	55 60 65
gcc ggc gtg gcc aag ggt gcc agc atg cgc agc ctg cgc gtg ctc aac	1135
Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn	
	70 75 80 85
tgc caa ggg aag ggc acg gtt agc ggc acc ctc ata ggc ctg gag ttt	1183
Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe	
	90 95 100
att cgg aaa agc cag ctg gtc cag cct gtg ggg cca ctg gtg gtg ctg	1231
Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu	
	105 110 115
ctg ccc ctg gcg ggt ggg tac agc cgc gtc ctc aac gcc gcc tgc cag	1279
Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln	
	120 125 130

cgc ctg gcg agg gct ggg gtc gtg ctg gtc acc gct gcc ggc aac ttc Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe 135 140 145	1327
cgg gac gat gcc tgc ctc tac tcc cca gcc tca gct ccc gag gtc atc Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile 150 155 160 165	1375
aca gtt ggg gcc acc aat gcc cag gac cag ccg gtg acc ctg ggg act Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr 170 175 180	1423
ttg ggg acc aac ttt ggc cgc tgt gtg gac ctc ttt gcc cca ggg gag Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu 185 190 195	1471
gac atc att ggt gcc tcc agc gac tgc agc acc tgc ttt gtg tca cag Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln 200 205 210	1519
agt ggg aca tca cag gct gct gcc cac gtg gct ggc att gca gcc atg Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met 215 220 225	1567
atg ctg tct gcc gag ccg gag ctc acc ctg gcc gag ttg agg cag aga Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg 230 235 240 245	1615
ctg atc cac ttc tct gcc aaa gat gtc atc aat gag gcc tgg ttc cct Leu Ile His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro 250 255 260	1663
gag gac cag cgg gta ctg acc ccc aac ctg gtg gcc gcc ctg ccc ccc Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro 265 270 275	1711
agc acc cat ggg gca ggt tgg cag ctg ttt tgc agg act gtg tgg tca Ser Thr His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser 280 285 290	1759
gca cac tcg ggg cct aca cgg atg gcc aca gcc atc gcc cgc tgc gcc Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Ile Ala Arg Cys Ala 295 300 305	1807
cca gat gag gag ctg ctg agc tgc tcc agt ttc tcc agg agt ggg aag Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys 310 315 320 325	1855
cgg cgg ggc gag cgc atg gag gcc caa ggg ggc aag ctg gtc tgc cgg Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg 330 335 340	1903
gcc cac aac gct ttt ggg ggt gag ggt gtc tac gcc att gcc agg tgc Ala His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys 345 350 355	1951

tgc ctg cta ccc cag gcc aac tgc agc gtc cac aca gct cca cca gct Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala 360 365 370	1999
gag gcc agc atg ggg acc cgt gtc cac tgc cac caa cag ggc cac gtc Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val 375 380 385	2047
ctc aca ggc tgc agc tcc cac tgg gag gtg gag gac ctt ggc acc cac Leu Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His 390 395 400 405	2095
aag ccg cct gtg ctg agg cca cga ggt cag ccc aac cag tgc gtg ggc Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly 410 415 420	2143
cac agg gag gcc agc atc cac gct tcc tgc tgc cat gcc cca ggt ctg His Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu 425 430 435	2191
gaa tgc aaa gtc aag gag cat gga atc ccg gcc cct cag gag cag gtg Glu Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val 440 445 450	2239
acc gtg gcc tgc gag gag ggc tgg acc ctg act ggc tgc agt gcc ctc Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu 455 460 465	2287
cct ggg acc tcc cac gtc ctg ggg gcc tac gcc gta gac aac acg tgt Pro Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys 470 475 480 485	2335
gta gtc agg agc cgg gac gtc agc act aca ggc agc acc agc gaa ggg Val Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly 490 495 500	2383
gcc gtg aca gcc gtt gcc atc tgc tgc cgg agc cgg cac ctg gcg cag Ala Val Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln 505 510 515	2431
gcc tcc cag gag ctc cag tgacagcccc atcccaggat ggggtgtctgg Ala Ser Gln Glu Leu Gln 520	2479
ggaggggtcaa gggctggggc tgagcttttaa aatgggttcg acttgctcct ctctcagccc	2539
tccatggcct ggcacgaggg gatgggggatg ctccgcctt tccggggctg ctggcctggc	2599
ccttgagtgg ggcagcctcc ttgcctggaa ctcaactcaact ctgggtgcct cctccccagg	2659
tggaggtgcc aggaagctcc ctccctcaact gtggggcatt tcaccattca aacaggtcga	2719
gctgtgctcg ggtgctgcca gctgctccca atgtgccgat gtccgtgggc agaatgactt	2779
ttattgagct cttgttccgt gccaggcatt caatcctcag gtctccacca aggaggcagg	2839
attcttccca tggatagggg agggggcggt aggggctgca gggacaaaca tcgttggggg	2899

```

gtgagtgtga aaggtgctga tggccctcat ctccagctaa ctgtggagaa gcccctgggg 2959
gctccctgat taatggaggc ttagctttct ggatggcatc tagccagagg ctggagacag 3019
gtgcgccccct ggtgggtcaca ggctgtgcct tgggttccctg agccaccttt actctgctct 3079
atgccaggct gtgctagcaa caccctaaagg tggcctgcgg ggagccatca cctaggactg 3139
actcggcagt gtgcagtggg gcatgcactg tctcagccaa cccgctccac taccggcag 3199
ggtagacatt cgcaccccta cttcacagag gaagaaacct ggaaccagag ggggcgtgcc 3259
tgccaagctc acacagcagg aactgagcca gaaacgcaga ttgggctggc tctgaagcca 3319
agcctcttct tacttcaccc ggctgggctc ctcattttta cgggtaacag tgaggctggg 3379
aaggggaaca cagaccagga agctcgggta gtgatggcag aacgatgcct gcaggcatgg 3439
aactttttcc gttatcacc aggcctgatt cactggcctg gcggagatgc ttctaaggca 3499
tggtcggggg agaggggcaa caactgtccc tccttgagca ccagcccccac ccaagcaagc 3559
agacatttat cttttgggtc tgcctctct gttgcctttt tacagccaac ttttctagac 3619
ctgttttgct tttgtaact gaagatattt attctgggtt ttgtagcatt tttattaata 3679
tggtgacttt ttaaaataaa aacaaacaaa cgttgtccta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3739
aaaaaaaaaa aaaaaaaa 3756

```

<210> 4
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Met Ser Pro Trp Lys Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu
1          5          10          15

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met
          20          25          30

Val Thr Asp Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His
          35          40          45

Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val
          50          55          60

Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser
65          70          75          80

```


Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu
 85 90 95

Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly
 100 105 110

Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu
 115 120 125

Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr
 130 135 140

Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Val Ile Thr Val Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro
 165 170 175

Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu
 180 185 190

Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr
 195 200 205

Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala
 210 215 220

Gly Ile Ala Ala Met Met Leu Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala
 225 230 235 240

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

Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val
 260 265 270

Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys
 275 280 285

Arg Thr Val Trp Ser Ala His Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala
 290 295 300

Ile Ala Arg Cys Ala Pro Asp Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe
305 310 315 320

Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly
325 330 335

Lys Leu Val Cys Arg Ala His Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr
340 345 350

Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His
355 360 365

Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His
370 375 380

Gln Gln Gly His Val Leu Thr Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu
385 390 395 400

Asp Leu Gly Thr His Lys Pro Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro
405 410 415

Asn Gln Cys Val Gly His Arg Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys
420 425 430

His Ala Pro Gly Leu Glu Cys Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala
435 440 445

Pro Gln Glu Gln Val Thr Val Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr
450 455 460

Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala
465 470 475 480

Val Asp Asn Thr Cys Val Val Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly
485 490 495

Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser
500 505 510

Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln
515 520

<210> 5
<211> 692
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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

Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp
 210 215 220
 Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly
 225 230 235 240
 Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln
 245 250 255
 Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg
 260 265 270
 Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro
 275 280 285
 Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu
 290 295 300
 Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp
 305 310 315 320
 Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val
 325 330 335
 Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly
 340 345 350
 Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile
 355 360 365
 Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly
 370 375 380
 Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile
 405 410 415
 His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
 420 425 430

Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr
 435 440 445
 His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
 450 455 460
 Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro Asp
 465 470 475 480
 Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
 485 490 495
 Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
 500 505 510
 Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
 515 520 525
 Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 530 535 540
 Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro
 565 570 575
 Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
 580 585 590
 Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
 595 600 605
 Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
 610 615 620
 Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
 625 630 635 640
 Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
 645 650 655
 Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
 660 665 670
 Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
 675 680 685
 Gln Glu Leu Gln
 690

<210> 6
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

Met Ser Pro Trp Lys Asp Gly Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu
 1 5 10 15

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met
 20 25 30

Val Thr Asp Phe Glu Asn Val Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His
 35 40 45

Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val
 50 55 60

Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu
 85 90 95

Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly
 100 105 110

Pro Leu Val Val Leu Leu Pro Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu
 115 120 125

Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr
 130 135 140

Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Gly Arg Thr Ser Leu Val Pro Pro Ala Thr Ala Ala Pro
 165 170 175

Ala Leu Cys His Arg Val Gly His His Arg Leu Leu Pro Thr Trp Leu
 180 185 190

Ala Leu Gln Pro
 195

10

<210> 7
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 7

	ggcgctttca ccagtggctg ggatgtgctc tgtagtttct gtgtgttaac tataagggtg	60
	actttatgct cattccctcc	80
5	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 8 ctaggcctcc ctttccttgt	20
15	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 9 ttccaagggtg acatttgtgg	20
25	<210> 10 <211> 17 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10 cctgcgcggtg ctcaact	17
30	<210> 11 <211> 22 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 11 ccgaataaac tccaggccta tg	22
40	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 12 ccgctaaccg tgcccttccc ttg	23
45	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 13 ctaggcctcc ctttccttgt	20
55	<210> 14 <211> 79 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	
60	tggcaggcgg cgttgaggac gcggtgtac ccacccgcca ggggcagcag caccaccagt	60
	ggccccacag gctggacca	79
60	<210> 15	

<211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 15
 gcctggagtt tattcgaaa 20

<210> 16
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16
 gagtagaggc aggcatcgtc 20
 15

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20

<400> 17
 gagtagaggc aggcatcgtc 20
 25

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30

<220>
 <223> Polipéptido sintetizado.
 <400> 18

Phe Ala Gln Ser Ile Pro Lys
1 5
 35

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40

<220>
 <223> Polipéptido sintetizado.
 <400> 19
 45

Asp Ser Leu Val Phe Ala Lys
1 5

<210> 20
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintetizado.
 55

<400> 20

Phe Ala Asn Ala Ile Pro Lys
1 5
 60

<210> 21
 <211> 733

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

5

```

gggatccgga gcccaaactct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg      60
aattcgaggg tgcaccgtca gtcttctctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga    120
tctcccggaac tcctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg    180
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg    240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact    300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg    360
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc    420
catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct    480
atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga    540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctct ctacagcaag ctcaccgtgg    600
acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc    660
acaaccacta caccgagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc    720
gactctagag gat      733

```

<210> 22
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 22
gcagcagcgg ccgcctagac accagcatac agagtgacc 39

15

<210> 23
<211> 37
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 23
gcagcagtcg actctggggc gcagcgggag atggctg 37

25

<210> 24
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 24
gcagcagcgg ccgcagtcg ccttgaaag acggaggca 39

35

<210> 25
<211> 37
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 25
gcagcagtcg acagggcctg ccccatgggt gctgggg 37

<210> 26
<211> 39
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

	<400> 26		
	gcagcagcgg ccgcctagac accagcatac agagtgacc	39	
5	<210> 27		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 27		
	ctggagctcc tgggaggcct gcgcc	25	
15	<210> 28		
	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 28		
	gcagcagcgg ccgcatgtcg ccttgaaag acggaggca	39	
25	<210> 29		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
30	<400> 29		
	gcagcagtcg acggcgatgg ctgtggccat ccgtgta	37	
35	<210> 30		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
40	<400> 30		
	tgtctttgcc cagagcatcc	20	
45	<210> 31		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
50	<400> 31		
	tattcatccg cccggtacc	19	
55	<210> 32		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
60	<400> 32		
	agatgtcatc aatgaggcct	20	
65	<210> 33		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
70	<400> 33		
	agctgccaac ctgcaaaaac	20	
75	<210> 34		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
80	<400> 34		
	ctctgaggtt gtgactcgtg tga	23	

	<210> 35	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 35	
	agcgttctcc actccacaag a	21
10	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 36	
	gagaatgatc tgcagcaccc a	21
20	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 37	
	tgctgatgac ggtgtcatag g	21
25	<210> 38	
	<211> 3636	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 38	

cagcgacgtc gaggcgctca tggttgcagg cgggcgcccgc cgttcagttc aggggtctgag	60
cctggaggag tgagccaggc agtgagactg gctcgggcgg gccgggacgc gtcgttgacg	120
cagcggtcc cagctcccag ccaggattcc gcgcgcccct tcacgcgccc tgctcctgaa	180
cttcagctcc tgcacagtcc tccccaccgc aaggctcaag gcgcgcggc cgtggaccgc	240
gcacggcctc taggtctcct cgccaggaca gcaacctctc ccctggccct catgggcacc	300
gtcagctcca ggcggtcctg gtggccgctg ccactgctgc tgctgctgct gctgctcctg	360
ggtcccgcgg gcgcccgtgc gcaggaggac gaggacggcg actacgagga gctgggtgcta	420
gccttgcggt cggaggagga cggcctggcc gaagcaccgc agcacggaac cacagccacc	480
ttccaccgct gcgccaagga tccgtggagg ttgcctggca cctacgtggt ggtgctgaag	540
gaggagaccc acctctcgca gtcagagcgc actgcccgc gcctgcaggc ccaggctgcc	600
cgccggggat acctcaccaa gatcctgcat gtcttccatg gccttcttcc tggcttctg	660
gtgaagatga gtggcgacct gctggagctg gccttgaagt tgccccatgt cgactacatc	720
gaggaggact cctctgtctt tgcccagagc atcccgtgga acctggagcg gattaccct	780
ccacggtacc gggcggatga ataccagccc ccgcagggag gcagcctggt ggaggtgtat	840
ctcctagaca ccagcataca gagtgaccac cgggaaatcg agggcagggt catggtcacc	900
gacttcgaga atgtgccga ggaggacggg acccgcttcc acagacaggc cagcaagtgt	960
gacagtcatg gcacccacct ggcaggggtg gtcagcggcc gggatgccgg cgtggccaag	1020
ggtgccagca tgcgcagcct gcgcgtgctc aactgccaaag ggaagggcac ggttagcggc	1080
accctcatag gcctggagtt tattcgaaa agccagctgg tccagcctgt ggggccactg	1140
gtggtgctgc tgcccctggc ggggtgggtac agccgcgtcc tcaacgcgc ctgccagcgc	1200
ctggcgaggg ctggggctgt gctggtcacc gctgccggca acttcgggga cgatgcctgc	1260
ctctactccc cagcctcagc tcccaggtc atcacagttg gggccaccaa tgcccaagac	1320
cagccggtga ccctggggac tttggggacc aactttggcc gctgtgtgga cctctttgcc	1380
ccaggggagg acatcattgg tgcctccagc gactgcagca cctgctttgt gtcacagagt	1440
gggacatcac aggtgctgc ccacgtggct ggcattgcag ccatgatgct gtctgccgag	1500
ccggagctca ccctggccga gttgaggcag agactgatcc acttctctgc caaagatgtc	1560
atcaatgagg cctggttccc tgaggaccag cgggtactga cccccaacct ggtggccgcc	1620
ctgcccccca gcacccatgg ggcaggttgg cagctgtttt gcaggactgt atggtcagca	1680
cactcggggc ctacacggat ggccacagcc gtcgcccgt gcgccccaga tgaggagctg	1740

ctgagctgct ccagttttctc caggagtgagg aagcggcggg gcgagcgcat ggaggcccaa	1800
gggggcaagc tgggtctgccc ggcccacaac gcttttgggg gtgaggggtgt ctacgccatt	1860
gccaggtgct gcctgctacc ccaggccaac tgcagcgtcc acacagctcc accagctgag	1920
gccagcatgg ggacccgtgt cactgcccac caacaggggc acgtcctcac aggtgcagc	1980
tccactggg aggtggagga ccttggcacc cacaagccgc ctgtgctgag gccacgaggt	2040
cagcccaacc agtgcgagg ggacaggag gccagcatcc acgcttctg ctgccatgcc	2100
ccaggtctgg aatgcaaagt caaggagcat ggaatccgg cccctcagga gcaggtgacc	2160
gtggcctgcg aggagggctg gacctgact ggctgcagtg cctccctgg gacctccac	2220
gtcctggggg cctacgccgt agacaacacg tgtgtagtca ggagccggga cgtcagcact	2280
acaggcagca ccagcgaagg ggccgtgaca gccgttgcca tctgctgccc gagccggcac	2340
ctggcgcagg cctcccagga gctccagtga cagccccatc ccaggatggg tgtctgggga	2400
gggtcaaggg ctggggctga gctttaaagt gggtccgact tgtccctctc tcagccctcc	2460
atggcctggc acgaggggat ggggatgctt ccgcctttcc ggggctgctg gcctggcct	2520
tgagtggggc agcctccttg cctggaactc actcactctg ggtgcctcct cccaggtgg	2580
aggtgccagg aagctccctc cctcactgtg gggcatttca ccattcaaac aggtcgagct	2640
gtgctcgggt gctgccagct gctcccaatg tgccgatgtc cgtgggcaga atgactttta	2700
ttgagctctt gttccgtgcc aggcattcaa tctcagggtc tccaccaagg aggcaggatt	2760
cttcccatgg ataggggagg gggcggtagg ggctgcaggg acaaacatcg ttgggggggtg	2820
agtgtgaaag gtgctgatgg ccctcatctc cagctaaactg tggagaagcc cctgggggct	2880
ccctgattaa tggaggctta gctttctgga tggcatctag ccagaggctg gagacagggtg	2940
cgcccctggt ggtcacaggc tgtgccttgg tttcctgagc cacctttact ctgctctatg	3000
ccaggctgtg ctagcaacac ccaaagggtg cctgcgggga gccatcacct aggactgact	3060
cggcagtggt cagtgggtgca tgactgtct cagccaaccc gctccactac ccggcagggt	3120
acacattcgc acccctactt cacagaggaa gaaacctgga accagagggg gcgtgcctgc	3180
caagctcaca cagcaggaac tgagccagaa acgcagattg ggctggctct gaagccaagc	3240
ctcttcttac ttcacccggc tgggtcctc atttttacgg gtaacagtga ggctgggaag	3300
gggaacacag accaggaagc tcggtgagtg atggcagaac gatgcctgca ggcattggaac	3360
ttttccggt atcacccagg cctgattcac tggcctggcg gagatgcttc taaggcatgg	3420
tcgggggaga gggccaacaa ctgtccctcc ttgagcacca gcccaccca agcaagcaga	3480
catttatctt ttgggtctgt cctctctgtt gcctttttac agccaacttt tctagacctg	3540
ttttgctttt gtaacttgaa gatatttatt ctgggttttg tagcattttt attaatatgg	3600
tgacttttta aaataaaaac aaacaaacgt tgctct	3636

<210> 39

<211> 39

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 544 479 T3

	<400> 39	
	gcagcagcgg ccgcctgctg ctgctgctgc tgctgctcc	39
5	<210> 40	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 40	
	gcagcagtcg acctggagct cctgggaggc ctgcgcc	37

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 2;
- (b) la secuencia de ADNc de PCSK9-b incluida en el N° de depósito de la ATCC®: PTA-7622, que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 2;
- (c) un polinucleótido que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 4;
- (d) la secuencia de ADNc de PCSK9-c incluida en el N° de depósito de la ATCC®: PTA-7622, que codifica la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 4; y
- (e) la secuencia complementaria completa de (a), (b), (c) o (d).

2. Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico aislado de la reivindicación 1.

3. Una célula hospedadora recombinante aislada que comprende las secuencias de vector de la reivindicación 2.

4. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 2; y
- (b) un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica expuesta en SEC ID N°: 4.

5. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al polipéptido aislado de SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4.

6. Una célula hospedadora recombinante que expresa el polipéptido aislado de la reivindicación 4.

7. Un método para producir un polipéptido aislado, que comprende:

- (a) cultivar la célula hospedadora recombinante de la reivindicación 6 en condiciones tales que dicho polipéptido se exprese; y
- (b) recuperar dicho polipéptido.

8. El polipéptido de la reivindicación 4 para su uso en prevenir, tratar o mejorar una afección médica.

9. Un método para diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica en un sujeto, que comprende:

- (a) determinar en una muestra biológica del sujeto la presencia o la ausencia de una mutación en el polinucleótido de la reivindicación 1; y
- (b) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica basándose en la presencia o la ausencia de dicha mutación.

10. Un método para diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica en un sujeto, que comprende:

- (a) determinar en una muestra biológica del sujeto la presencia o el grado de expresión del polipéptido de la reivindicación 4 en una muestra; y
- (b) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica basándose en la presencia o el grado de expresión del polipéptido.

11. El polipéptido de la reivindicación 4 para el uso de la reivindicación 8 en donde la afección médica se selecciona del grupo que consiste en: trastorno cardiovascular; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia dominante autosómica; trastornos asociados con la función aberrante del receptor de LDL; trastornos asociados con apolipoproteína B; trastornos asociados con la hipercolesterolemia recesiva autosómica; trastornos asociados con el colesterol elevado; trastornos asociados con LDL elevadas; trastornos asociados con la velocidad de eliminación reducida de las LDL en el hígado; trastornos asociados con la producción elevada de apoB de LDL; hipercolesterolemia familiar; trastornos del metabolismo de lípidos; LDL elevadas; depósitos de colesterol; xantomas de tendón; ateroma; arteriosclerosis prematura; enfermedad coronaria; apolipoproteína B defectuosa familiar; hipersensibilidad a estatinas; trastornos asociados con la degradación acelerada de LDLR; trastornos de la diferenciación neural; un trastorno metabólico; un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en: dislipidemia; dislipidemia diabética; dislipidemia mixta; hipercolesterolemia; hipertrigliceridemia; diabetes mellitus de tipo II; diabetes de tipo I; resistencia a la insulina; hiperlipidemia; obesidad; y anorexia nerviosa.

12. El método de las reivindicaciones 9 o 10 en donde la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en: trastorno cardiovascular; hipercolesterolemia; hipercolesterolemia dominante autosómica; trastornos asociados con la función aberrante del receptor de LDL; trastornos asociados con apolipoproteína B; trastornos asociados con la

5 hipercolesterolemia recesiva autosómica; trastornos asociados con el colesterol elevado; trastornos asociados con LDL elevadas; trastornos asociados con la velocidad de eliminación reducida de las LDL en el hígado; trastornos asociados con la producción elevada de apoB de LDL; hipercolesterolemia familiar; trastornos del metabolismo de lípidos; LDL elevadas; depósitos de colesterol; xantomas de tendón; ateroma; arteriosclerosis prematura; enfermedad coronaria; apolipoproteína B defectuosa familiar; hipersensibilidad a estatinas; trastornos asociados con la degradación acelerada de LDLR; trastornos de la diferenciación neural; un trastorno metabólico; un trastorno metabólico seleccionado del grupo que consiste en: dislipidemia; dislipidemia diabética; dislipidemia mixta; hipercolesterolemia; hipertrigliceridemia; diabetes mellitus de tipo II; diabetes de tipo I; resistencia a la insulina; hiperlipidemia; obesidad; y anorexia nerviosa.

10

FIG. 1A.

1 GATGACTTGGGTCCTTCTTGGCAGTAGCATTGCCAGCTGATGGCCTTGGACAGTTACCTG 60
 61 CCCTCTCTAGGCCTCCCTTTTCCTTGTCTATGAAATACATTATAGAATAGGATGTAGTGTG 120
 121 TGAGGATTTTGGAGGTTAAACGAGTGAATATATTTAAGGCGCTTTCACCAGTGCCTGG 180
 181 GATGTGCTCTGTAGTTTCTGTGTGTTAACTATAAGGTTGACTTTATGCTCATTCCCTCCT 240
 241 CTCCCACAAATGTCGCCTTGGAAAGACGGAGGCAGCCTGGTGGAGGTGTATCTCCTAGAC 300
 1 M S P W K D G G S L V E V Y L L D 17
 301 ACCAGCATACAGAGTGACCACCGGAAATCGAGGGCAGGGTCATGGTCACCGACTTCGAG 360
 18 T S I Q S D H R E I E G R V M V T D F E 37
 361 AATGTGCCCCGAGGAGGACGGGACCCGCTTCCACAGACAGGCCAGCAAGTGTGACAGTCAT 420
 38 N V P E E D G T R F H R Q A S K C D S H 57
 421 GGCACCCACCTGGCAGGAGTGGTCAGCGGCCGGGATGCCGGCGTGGCCAAGGGTGCCAGC 480
 58 G T H L A G V V S G R D A G V A K G A S 77
 481 ATGCGCAGCCTGCGCGTGCTCAACTGCCAAGGGAAGGGCACGGTTAGCGGCACCCTCATA 540
 78 M R S L R V L N C Q G K G T V S G T L I 97
 541 GGCCTGGAGTTTATTTCGGAAGCCAGCTGGTCCAGCCTGTGGGGCCACTGGTGGTGCTG 600
 98 G L E F I R K S Q L V Q P V G P L V V L 117
 601 CTGCCCCCTGGCGGGTGGGTACAGCCGCGTCCTCAACGCCGCTGCCAGCGCCTGGCGAGG 660
 118 L P L A G G Y S R V L N A A C Q R L A R 137
 661 GCTGGGGTCGTGCTGGTCACCGCTGCCGGCAACTTCCGGGACGATGCCTGCCTCTACTCC 720
 138 A G V V L V T A A G N F R D D A C L Y S 157
 721 CCAGCCTCAGCTCCCGAGGTCATCACAGTTGGGGCCACCAATGCCCAGGACCAGCCGGTG 780
 158 P A S A P E V I T V G A T N A Q D Q P V 177
 781 ACCCTGGGGACTTTGGGGACCAACTTTGGCCGCTGTGTGGACCTCTTTGCCCCAGGGGAG 840
 178 T L G T L G T N F G R C V D L F A P G E 197
 841 GACATCATTGGTGCCTCCAGCGACTGCAGCACCTGCTTTGTGTACAGAGTGGGACATCA 900
 198 D I I G A S S D C S T C F V S Q S G T S 217
 901 CAGGCTGCTGCCACGTGGCTGGCATTGCAGCCATGATGCTGTCTGCCGAGCCGGAGCTC 960
 218 Q A A A H V A G I A A M M L S A E P E L 237

FIG. 1B

961 ACCCTGGCCGAGTTGAGGCAGAGACTGATCCACTTCTCTGCCAAAGATGTCATCAATGAG 1020
 238 T L A E L R Q R L I H F S A K D V I N E 257

1021 GCCTGGTTCCCTGAGGACCAGCGGTACTGACCCCCAACCTGGTGGCCGCCCTGCCCCC 1080
 258 A W F P E D Q R V L T P N L V A A L P P 277

1081 AGCACCCATGGGGCAGGCCCTTTTTCAGGTTGGCAGCTGTTTTCAGGACTGTGTGGTC 1140
 278 S T H G A G P F C R L A A V L Q D C V V 297

1141 AGCACACTCGGGGCCTACACGGATGGCCACAGCCATCGCCCGCTGCGCCCCAGATGAGGA 1200
 298 S T L G A Y T D G H S H R P L R P R * 315

1201 GCTGCTGAGCTGCTCCAGTTTCTCCAGGAGTGGGAAGCGGCGGGGCGAGCGCATGGAGGC 1260

1261 CCAAGGGGGCAAGCTGGTCTGCCGGGGCCACAACGCTTTTGGGGGTGAGGGTGTCTACGC 1320

1321 CATTGCCAGGTGCTGCCTGCTACCCCAGGCCAACTGCAGCGTCCACACAGCTCCACCAGC 1380

1381 TGAGGCCAGCATGGGGACCCGTGTCCACTGCCACCAACAGGGCCACGTCCTCACAGGCTG 1440

1441 CAGCTCCCCTGGGAGGTGGAGGACCTTGGCACCCACAAGCCGCCTGTGCTGAGGCCACG 1500

1501 AGGTCAGCCCAACCAGTGCGTGGGCCACAGGGAGGCCAGCATCCACGCTTCTGCTGCCA 1560

1561 TGCCCCAGGTCTGGAATGCAAAGTCAAGGAGCATGGAATCCCGGGCCCTCAGGAGCAGGT 1620

1621 GACCGTGGCCTGCGAGGAGGGCTGGACCCTGACTGGCTGCAGTGCCCTCCCTGGGACCTC 1680

1681 CCACGTCTTGGGGCCTACGCCGTAGACAACACGTGTGTAGTCAGGAGCCGGGACGTCAG 1740

1741 CACTACAGGCAGCACCAGCGAAGAGGCCGTGACAGCCGTTGCCATCTGCTGCCGGAGCCG 1800

1801 GCACCTGGCGCAGGCCTCCCAGGAGCTCCAGTGACAGCCCCATCCCAGGATGGGTGTCTG 1860

1861 GGGAGGGTCAAGGGCTGGGGCTGAGCTTTAAATGGTTCCGACTTGTCCCTCTCTCAGCC 1920

1921 CTCCATGGCCTGGCAGAGGGGATGGGGATGCTTCCGCCTTCCGGGGCTGCTGGCCTGG 1980

1981 CCCTTGAGTGGGGCAGCCTCCTTGCTGGAACCTCACTCACTCTGGGTGCCCTCCTCCCCAG 2040

2041 GTGGAGGTGCCAGGAAGCTCCCTCCCTCACTGTGGGGCATTTACCATTCAAACAGGTCG 2100

FIG. 1C

2101 AGCTGTGCTCGGGTGCTGCCAGCTGCTCCCAATGTGCCGATGTCCGTGGGCAGAATGACT 2160
 2161 TTTATTGAGCTCTTGTTCGGTGCCAGGCATTCAATCCTCAGGTCTCCACCAAGGAGGCAG 2220
 2221 GATTCTTCCCATGGATAGGGGAGGGGGCGGTAGGGGCTGCAGGGACAAACATCGTTGGGG 2280
 2281 GGTGAGTGTGAAAGGTGCTGATGGCCCTCATCTCCAGCTAACTGTGGAGAAGCCCCCTGGG 2340
 2341 GGCTCCCTGATTAATGGAGGCTTAGCTTTCTGGATGGCATCTAGCCAGAGGCTGGAGACA 2400
 2401 GGTGTGCCCCCTGGTGGTCACAGGCTGTGCCTTGGTTTCCTGAGCCACCTTTACTCTGCTC 2460
 2461 TATGCCAGGCTGTGCTAGCAACACCCAAAGGTGGCCTGCGGGAGCCATCACCTAGGACT 2520
 2521 GACTCGGCAGTGTGCAGTGGTGCATGCACTGTCTCAGCCAACCCGCTCCACTACCCGGCA 2580
 2581 GGGTACACATTTCGACCCCTACTTCACAGAGGAAGAAACCTGGAACCAGAGGGGGCGTGC 2640
 2641 CTGCCAAGCTCACACAGCAGGAAGTGAAGCAGAAACGCAGATTGGGCTGGCTCTGAAGCC 2700
 2701 AAGCCTCTTCTTACTTCACCCGGCTGGGCTCCTCATTTTACGGGTAACAGTGAGGCTGG 2760
 2761 GAAGGGGAACACAGACCAGGAAGCTCGGTGAGTGATGGCAGAACGATGCCTGCAGGCATG 2820
 2821 GAACTTTTTCCGTTATCACCCAGGCCTGATTCAGTGGCCTGGCGGAGATGCTTCTAAGGC 2880
 2881 ATGGTCGGGGGAGAGGGCCAACAAGTGTCCCTCCTTGAGCACCAGCCCCACCCAAGCAAG 2940
 2941 CAGACATTTATCTTTTGGGTCTGTCTCTCTGTTCCTTTTTACAGCCAACCTTTTCTAGA 3000
 3001 CCTGTTTTGCTTTTGTAACTTGAAGATATTTATTCTGGGTTTTGTAGCATTTTTATTAAT 3060
 3061 ATGGTGACTTTTTAAAATAAAAAACAAACAAACGTTGTCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3120
 3121 AA 3175

FIG. 2A

1 TGCTAGCAGCAACCTGCCTGAAGTCTTCCTTTGGCCTGGCTGAGAGTTTCTGAGACCTGC 60
 61 GCTGGAGCGGAGGTGCTTCCTTCCTTGCTTCCTTTCTTCCTCTCTCCCTTCTCCATCCAG 120
 121 CAGGCTGGACCTGCCTGGCATCTGTGAGCTCTCCCTACTTTCTCCTATAACCCTAACCTTT 180
 181 GTCCTGCATGGGCGACTCCCCAGTGAGTCTCTTGCAGCTTTTACCCAGTGCCTGCTTC 240
 241 TTGGAGAATCCAACTGATCCAGTTAGGGATGATAAAGTGTAGGGTAGGCGCTCGGTGAC 300
 301 TGTTCCTCTGAGGTTGTGACTCGTGTGAGGCAGAAGCAGTCCCCGTGAGCCCTCCTGGT 360
 361 ATCTTGTGGAGTGGAGAACGCTTGGACCTGGAGCCAGGAGGCCAGACATACATCCTGTC 420
 421 CGAGCTGCAGCTTCCTGTCTCTAAAATGAGCCGGCCAGCGCAGGTGGCCAGACATCACTG 480
 481 TTATTCTCCTTTGAGTCTTTAAATCTTGTTGTCTTTCTTGACACTCGGTGAGCTGTGAA 540
 541 AGGCTATAATAGGGGCTTTATTTTACACTTTGATACTATTTTTTGAACATTTCATATTATT 600
 601 GTTAGATATTGATATTCATATGAAGGAGCAGGATGACTTGGGTCCTTCTTGGCAGTAGCA 660
 661 TTGCCAGCTGATGGCCTTGGACAGTTACCTGCCCTCTCTAGGCCTCCCTTTCCTTGTCTA 720
 721 TGAAATACATTATAGAATAGGATGTAGTGTGTGAGGATTTTTTGGAGGTTAAACGAGTGA 780
 781 ATATATTTAAGGCGCTTTCACCAGTGCCTGGGATGTGCTCTGTAGTTTCTGTGTGTTAAC 840
 841 TATAAGGTTGACTTTATGCTCATTCCTCCTCTCCCACAAATGTCGCCTTGGAAAGACGG 900
 1 M S P W K D G 7
 901 AGGCAGCCTGGTGGAGGTGTATCTCCTAGACACCAGCATAACAGAGTGACCACCGGGAAAT 960
 8 G S L V E V Y L L D T S I Q S D H R E I 27
 961 CGAGGGCAGGGTCATGGTCACCGACTTCGAGAATGTGCCCCGAGGAGGACGGGACCCGCTT 1020
 28 E G R V M V T D F E N V P E E D G T R F 47
 1021 CCACAGACAGGCCAGCAAGTGTGACAGTCATGGCACCCACCTGGCAGGGGTGGTCAGCGG 1080
 48 H R Q A S K C D S H G T H L A G V V S G 67

FIG. 2B

1081 CCGGGATGCCGCGTGGCCAAAGGTGCCAGCATGCGCAGCCTGCGCGTGCTCAACTGCCA 1140
 68 R D A G V A K G A S M R S L R V L N C Q 87

1141 AGGGAAGGGCACGGTTAGCGGCACCCTCATAGGCCTGGAGTTTATTTCGGAAAAGCCAGCT 1200
 88 G K G T V S G T L I G L E F I R K S Q L 107

1201 GGTCCAGCCTGTGGGGCCACTGGTGGTGTCTGCTGCCCCCTGGCGGGTGGGTACAGCCGCGT 1260
 108 V Q P V G P L V V L L P L A G G Y S R V 127

1261 CCTCAACGCCGCGCTGCCAGCGCCTGGCGAGGGCTGGGGTCTGTGCTGGTCAACGCTGCCGG 1320
 128 L N A A C Q R L A R A G V V L V T A A G 147

1321 CAACTTCCGGGACGATGCCTGCCTCTACTCCCCAGCCTCAGCTCCCCGAGGTCATCACAGT 1380
 148 N F R D D A C L Y S P A S A P E V I T V 167
 * *

1381 TGGGGCCACCAATGCCCAGGACCAGCCGGTGACCCTGGGGACTTTGGGGACCAACTTTGG 1440
 168 G A T N A Q D Q P V T L G T L G T N F G 187

1441 CCGCTGTGTGGACCTCTTTGCCCCAGGGGAGGACATCATTGGTGCCTCCAGCGACTGCAG 1500
 188 R C V D L F A P G E D I I G A S S D C S 207
 *

1501 CACCTGCTTTGTGTACAGAGTGGGACATCACAGGCTGCTGCCCCACGTGGCTGGCATTGC 1560
 208 T C F V S Q S G T S Q A A A H V A G I A 227

1561 AGCCATGATGCTGTCTGCCGAGCCGGAGCTCACCCCTGGCCGAGTTGAGGCAGAGACTGAT 1620
 228 A M M L S A E P E L T L A E L R Q R L I 247

1621 CCACTTCTCTGCCAAAGATGTCATCAATGAGGCCTGGTTCCCTGAGGACCAGCGGGTACT 1680
 248 H F S A K D V I N E A W F P E D Q R V L 267

1681 GACCCCCAACCTGGTGGCCGCCCTGCCCCCAGCACCCATGGGGCAGGTGGCAGCTGTT 1740
 268 T P N L V A A L P P S T H G A G W Q L F 287

1741 TTGCAGGACTGTGTGGTCAGCACACTCGGGGCCTACACGGATGGCCACAGCCATCGCCCC 1800
 288 C R T V W S A H S G P T R M A T A I A R 307

1801 CTGCGCCCCAGATGAGGAGCTGCTGAGCTGCTCCAGTTTCTCCAGGAGTGGGAAGCGGG 1860
 308 C A P D E E L L S C S S F S R S G K R R 327

1861 GGGCGAGCGCATGGAGGCCCAAGGGGGCAAGCTGGTCTGCGGGGCCACAAACGCTTTTGG 1920
 328 G E R M E A Q G G K L V C R A H N A F G 347

1921 GGGTGAGGGTGTCTACGCCATTGCCAGGTGCTGCCTGCTACCCCAGGCCAACTGCAGCGT 1980
 348 G E G V Y A I A R C C L L P Q A N C S V 367

FIG. 2C

1981 CCACACAGCTCCACCAGCTGAGGCCAGCATGGGGACCCGTGTCCACTGCCACCAACAGGG 2040
 368 H T A P P A E A S M G T R V H C H Q Q G 387

 2041 CCACGTCCTCACAGGCTGCAGCTCCCCTGGGAGGTGGAGGACCTTGGCACCCACAAGCC 2100
 388 H V L T G C S S H W E V E D L G T H K P 407

 2101 GCCTGTGCTGAGGCCACGAGGTCAGCCCAACCAGTGCCTGGGCCACAGGGAGGCCAGCAT 2160
 408 P V L R P R G Q P N Q C V G H R E A S I 427

 2161 CCACGCTTCCTGCTGCCATGCCCCAGGTCTGGAATGCAAAGTCAAGGAGCATGGAATCCC 2220
 428 H A S C C H A P G L E C K V K E H G I P 447

 2221 GGCCCCCTCAGGAGCAGGTGACCGTGGCCTGCGAGGAGGGCTGGACCCCTGACTGGCTGCAG 2280
 448 A P Q E Q V T V A C E E G W T L T G C S 467

 2281 TGCCCTCCCTGGGACCTCCCACGTCTGGGGGCCCTACGCCGTAGACAACACGTGTGTAGT 2340
 468 A L P G T S H V L G A Y A V D N T C V V 487

 2341 CAGGAGCCGGGACGTGAGCACTACAGGCAGCACCAGCGAAGGGGCCGTGACAGCCGTTGC 2400
 488 R S R D V S T T G S T S E G A V T A V A 507

 2401 CATCTGCTGCCGGAGCCGGCACCTGGCGCAGGCCTCCCAGGAGCTCCAGTGACAGCCCCA 2460
 508 I C C R S R H L A Q A S Q E L Q * 523

 2461 TCCCAGGATGGGTGTCTGGGGAGGGTCAAGGGCTGGGGCTGAGCTTTAAATGGTTCCGA 2520

 2521 CTTGTCCCTCTCTCAGCCCTCCATGGCCTGGCAGGAGGGATGGGGATGCTTCCGCCTTT 2580

 2581 CCGGGGCTGCTGGCCTGGCCCTTGAGTGGGGCAGCCTCCTTGCTGGAACCTCACTCACTC 2640

 2641 TGGGTGCCTCCTCCCCAGGTGGAGGTGCCAGGAAGCTCCCTCCCTCACTGTGGGGCATTT 2700

 2701 CACCATTCAAACAGGTCGAGCTGTGCTCGGGTGTGCTGCCAGCTGCTCCCAATGTGCCGATG 2760

 2761 TCCGTGGGCAGAATGACTTTTATTGAGCTCTTGTTCCGTGCCAGGCATTCAATCCTCAGG 2820

 2821 TCTCCACCAAGGAGGCAGGATTCTTCCCATGGATAGGGGAGGGGGCGGTAGGGGCTGCAG 2880

 2881 GGACAAACATCGTTGGGGGGTGAGTGTGAAAGGTGCTGATGGCCCTCATCTCCAGCTAAC 2940

 2941 TGTGGAGAAGCCCCTGGGGGCTCCCTGATTAATGGAGGCTTAGCTTTCTGGATGGCATCT 3000

FIG. 2D

3001 AGCCAGAGGCTGGAGACAGGTGCGCCCCTGGTGGTCACAGGCTGTGCCTTGGTTTCCTGA 3060
 3061 GCCACCTTTACTCTGCTCTATGCCAGGCTGTGCTAGCAACACCCAAAGGTGGCCTGCGGG 3120
 3121 GAGCCATCACCTAGGACTGACTCGGCAGTGTGCAGTGGTGCATGCACTGTCTCAGCCAAC 3180
 3181 CCGCTCCACTACCCGGCAGGTACACATTTCGCACCCCTACTTCACAGAGGAAGAAACCTG 3240
 3241 GAACCAGAGGGGGCGTGCCTGCCAAGCTCACACAGCAGGAAGTGAAGCCAGAAACGCAGAT 3300
 3301 TGGGCTGGCTCTGAAGCCAAGCCTCTTCTTACTTCACCCGGCTGGGCTCCTCATTTTTAC 3360
 3361 GGGTAACAGTGAGGCTGGGAAGGGGAACACAGACCAGGAAGCTCGGTGAGTGATGGCAGA 3420
 3421 ACGATGCCTGCAGGCATGGAACCTTTTCCGTTATCACCCAGGCCTGATTCACTGGCCTGG 3480
 3481 CGGAGATGCTTCTAAGGCATGGTCGGGGGAGAGGGCCAACAACGTCCCTCCTTGAGCAC 3540
 3541 CAGCCCCACCCAAGCAAGCAGACATTTATCTTTTGGGTCTGTCTCTCTGTTCCTTTTT 3600
 3601 ACAGCCAACCTTTCTAGACCTGTTTGTCTTTGTAACTTGAAGATATTTATTCTGGGTTT 3660
 3661 TGTAGCATTTTTATTAATATGGTGACTTTTTAAAATAAAAACAAACAAACGTTGTCCTAA 3720
 3721 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3756

FIG. 3A

PCSK9	(1)	MGTVSSRRSWPLPLLLLLLLLPAGARAQEDGDGYEELVIALRSEED	50
variante de PCSK9	(1)	-----	
PCSK9b	(1)	-----	
PCSK9c	(1)	-----	
PCSK9	(51)	GLAEAPHEGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEETHLSQSERTARRLQA	100
variante de PCSK9	(1)	-----	
PCSK9b	(1)	-----	
PCSK9c	(1)	-----	
PCSK9	(101)	QAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDSSVF	150
variante de PCSK9	(1)	-----	
PCSK9b	(1)	-----	
PCSK9c	(1)	-----	
PCSK9	(151)	AQSI PNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV	200
variante de PCSK9	(1)	-----MSPWKDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV	
PCSK9b	(1)	-----MSPWKDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV	
PCSK9c	(1)	-----MSPWKDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRV	
PCSK9	(201)	MVTD FENVP EEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVVSGRDAGVAKGASMRSL	250
variante de PCSK9	(32)	MVTD FENVP EEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVVSGRDAGVAKGASMRSL	
PCSK9b	(32)	MVTD FENVP EEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVVSGRDAGVAKGASMRSL	
PCSK9c	(32)	MVTD FENVP EEDGTRFHRQASKCD SHGTHLAGVVVSGRDAGVAKGASMRSL	

FIG. 3B

PCSK9 variante de PCSK9	(251)	251	RVLNCQKGTSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAA	300
	(82)		RVLNCQKGTSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAA	
	(82)		RVLNCQKGTSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAA	
	(82)		RVLNCQKGTSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAA	
PCSK9	(301)	301	CORLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT	350
	(132)		CORLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT	
	(132)		CORLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT	
	(132)		CORLARAGVVLVTAAGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGT	
PCSK9 variante de PCSK9	(351)	351	LGTNFGRCVDLFAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML	400
	(182)		VGHRLLPFWALQP-----	
	(182)		LGTNFGRCVDLFAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML	
	(182)		LGTNFGRCVDLFAPGEDII GASSDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMML	
PCSK9 variante de PCSK9	(401)	401	SAPELTLAELRQRLIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHG	450
	(197)		-----	
	(232)		SAPELTLAELRQRLIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHG	
	(232)		SAPELTLAELRQRLIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLT PNLVAALPPSTHG	
PCSK9 variante de PCSK9	(451)	451	AGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAWARCAPDEELLSCSSFSGKRRGERM	500
	(197)		-----	
	(282)		AGPFCRLAELVLDQCVSTLCAVTDGSHRPLRPR-----	
	(282)		AGWQLFCRTVWSAHS GPTRMATAWARCAPDEELLSCSSFSGKRRGERM	

FIG. 3C

PCSK9	(501)	501	EAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRV	550
variante de PCSK9	(197)		-----	
PCSK9b	(316)		-----	
PCSK9c	(332)		EAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRV	
PCSK9	(551)	551	HCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASC	600
variante de PCSK9	(197)		-----	
PCSK9b	(316)		-----	
PCSK9c	(382)		HCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASC	
PCSK9	(601)	601	CHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAV	650
variante de PCSK9	(197)		-----	
PCSK9b	(316)		-----	
PCSK9c	(432)		CHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAV	
PCSK9	(651)	651	DNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQ	692
variante de PCSK9	(197)		-----	
PCSK9b	(316)		-----	
PCSK9c	(482)		DNTCVVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQ	

FIG.4

PCSK9b

Proteína	Referencia Genbank	Identidad	Similitud
PCSK9 humana	gi NM_174936	40,8 %	40,6 %
Variante de PCSK9 humana	gi AK_124635	53,7 %	53,3 %
PCSK9 humana - Dominio catalítico	gi NM_174936	100,0 %	100,0 %
Variante de PCSK9 humana - Dominio catalítico	gi AK_124635	100,0 %	100,0 %

PCSK9c

Proteína	Referencia Genbank	Identidad	Similitud
PCSK9 humana	gi NM_174936	74,9 %	74,7 %
Variante de PCSK9 humana	gi AK_124635	32,3 %	32,1 %
PCSK9 humana - Dominio catalítico	gi NM_174936	100,0 %	100,0 %
Variante de PCSK9 humana - Dominio catalítico	gi AK_124635	100,0 %	100,0 %

FIG. 5

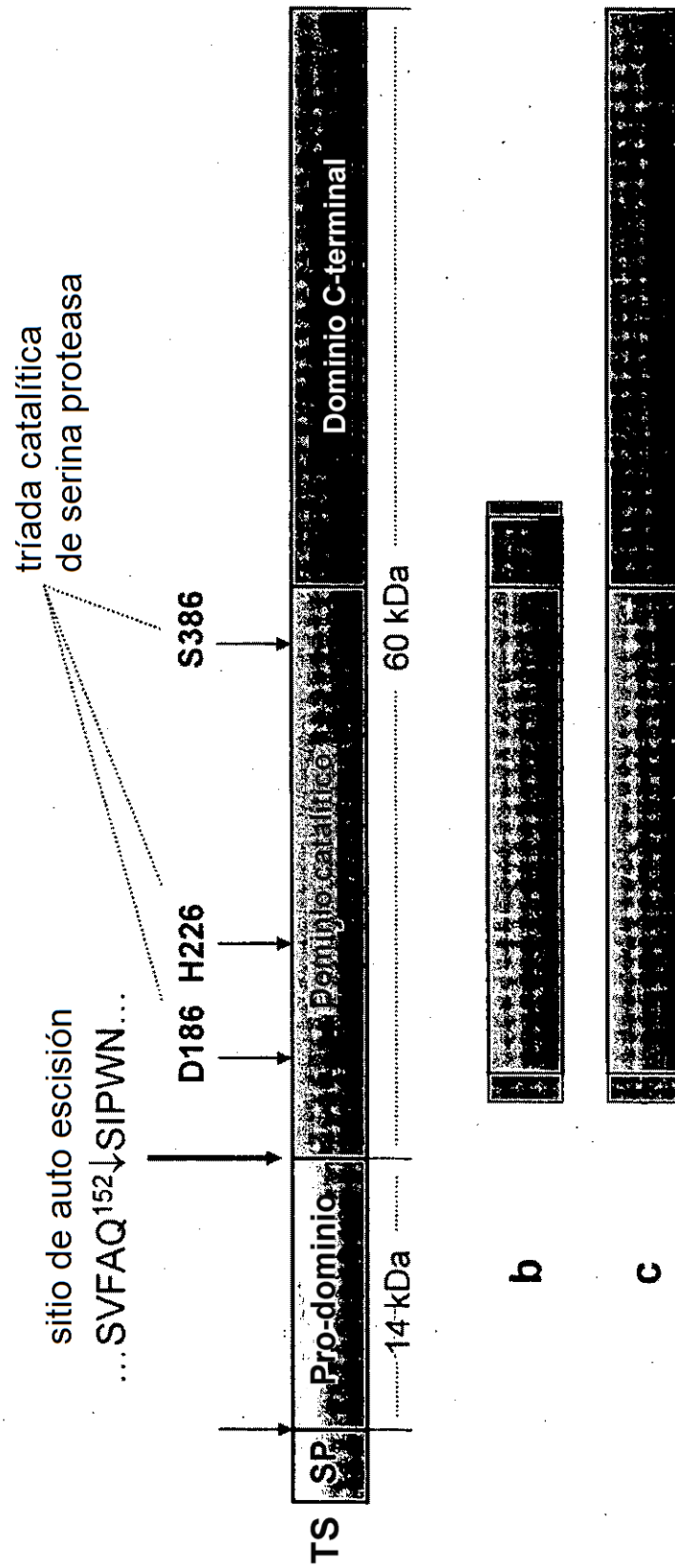


FIG. 6

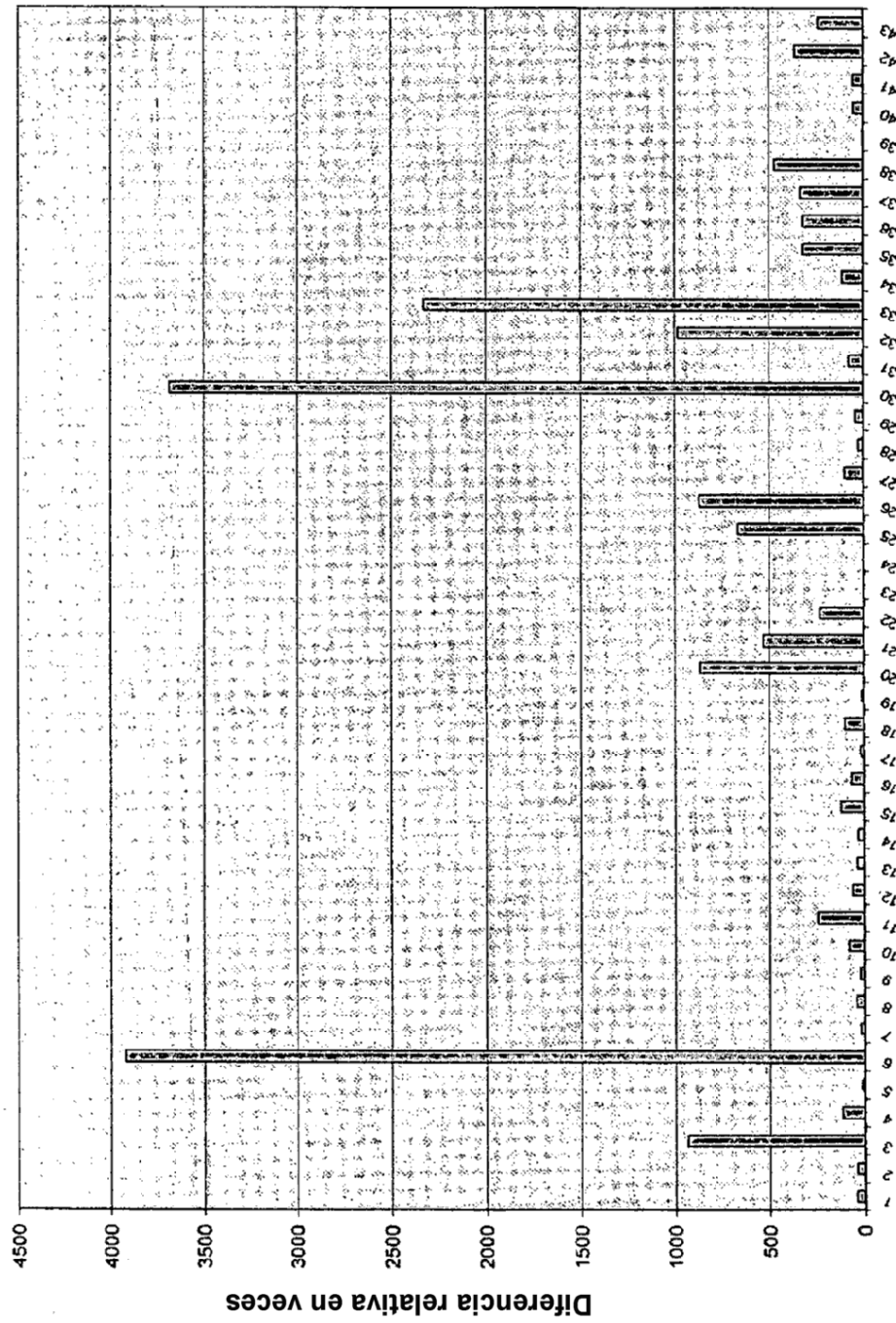
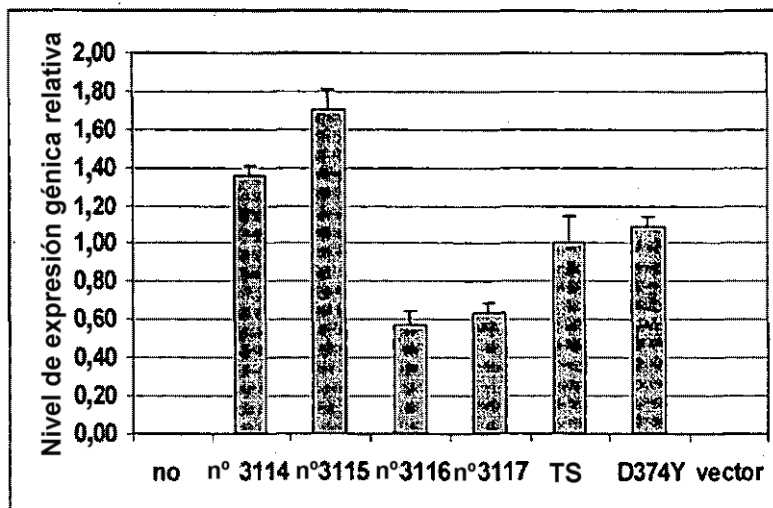


FIG. 7

A.



B.

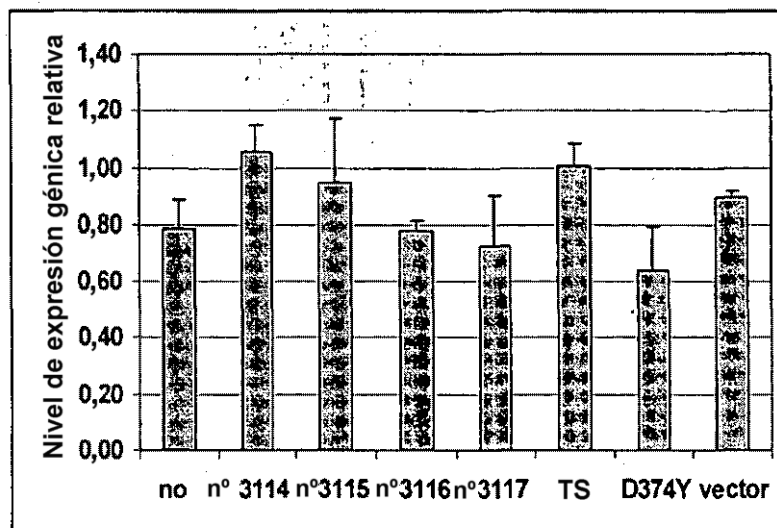
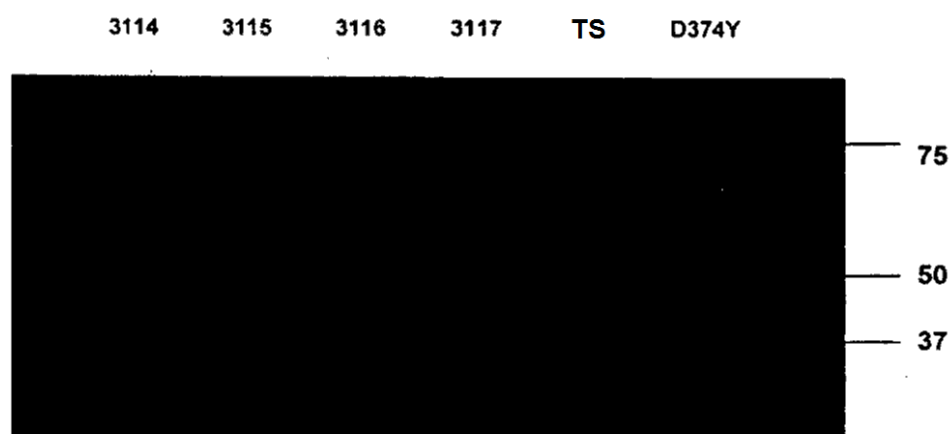


FIG. 8

A.



B.

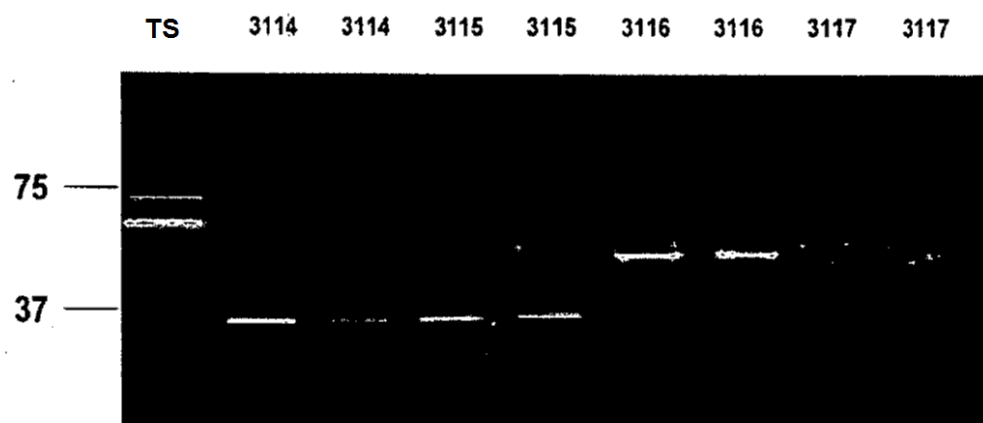
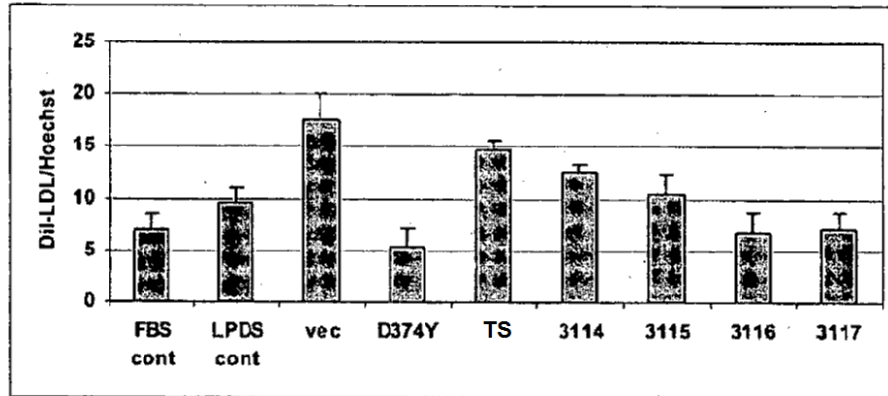


FIG. 9

A.



B.

