

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 532**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2003 E 03711193 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 1560593**

54 Título: **Nueva composición y métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune**

30 Prioridad:

**25.10.2002 US 421236 P**

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

**15.07.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CLARK, HILARY;  
EATON, DAN L.;  
GURNEY, AUSTIN L. y  
WRANIK, BERND**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 577 532 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

Nueva composición y métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades relacionadas con el sistema inmune e inflamatorias son una manifestación o consecuencia de rutas biológicas interconectadas bastante complejas, a menudo múltiples que en la fisiología normal responden a daño o lesión, inician la reparación del daño o lesión, y aumentan la defensa innata y adquirida frente a organismos extraños. La enfermedad por la patología se produce cuando estas rutas fisiológicas normales causan daño o lesión ya sea relacionada de forma directa con la intensidad de la respuesta, como consecuencia de regulación anómala o estimulación excesiva, como una reacción hacia sí misma, o como una combinación de las mismas.

Aunque la génesis de estas enfermedades a menudo involucra a rutas de múltiples etapas y a menudo a múltiples sistemas/rutas biológicas diferentes, la intervención en puntos críticos en una o más de estas rutas puede tener un efecto paliativo o terapéutico. La intervención terapéutica se puede producir ya sea por antagonismo de un proceso/ruta perjudicial o por la estimulación de un proceso/ruta beneficioso.

Se conocen muchas enfermedades relacionadas con la inmunidad y se han estudiado ampliamente. Tales enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades por inmunodeficiencia, tumor maligno, etc.

Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmune de los mamíferos. Los linfocitos T reconocen los antígenos que están asociados a una auto-molécula codificada por genes dentro del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). El antígeno se puede presentar junto con moléculas de MHC en la superficie de células de presentación de antígeno, células infectadas por virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de linfocitos T elimina estas células alteradas que representan una amenaza para la salud del mamífero hospedador. Los linfocitos T incluyen linfocitos T auxiliares y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T auxiliares proliferan ampliamente después del reconocimiento de un complejo de antígeno-MHC en una célula de presentación de antígeno. Los linfocitos T de colaboración también secretan diversas citoquinas, es decir, linfoquinas, que desempeñan un papel fundamental en la activación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y otras diversas células que participan en la respuesta inmune.

Algunas enfermedades relacionadas con el sistema inmune se podrían tratar suprimiendo la respuesta inmune. El uso de anticuerpos de neutralización que inhiben moléculas que tienen actividad estimuladora inmune sería beneficioso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Se pueden usar moléculas que inhiben la respuesta inmune (proteínas directamente o mediante el uso de agonistas de anticuerpos) para inhibir la respuesta inmune y por lo tanto mejorar la enfermedad relacionada con el sistema inmune.

Se sabe que los de restricción enzimática son importantes reguladores de la inflamación. En el presente documento, los de restricción enzimática se activaron y se analizó el perfil de los genes expresados de forma diferencial después de la activación. Como tal, los genes específicos de activación pueden ser dianas terapéuticas potenciales. La coestimulación *in vivo* es necesaria para una respuesta proliferativa inmune productiva. La lista de moléculas coestimuladoras es bastante amplia y aún no queda claro qué moléculas coestimuladoras desempeñan papeles fundamentales en diferentes tipos de y etapas de la inflamación.

La expresión trastorno intestinal inflamatorio ("IBD") describe un grupo de trastornos inflamatorios crónicos de causas desconocidas en el que el intestino (intestino) se inflama, causando a menudo calambres o diarrea recurrentes. Se calcula que la prevalencia de la IBD en Estados Unidos es de aproximadamente 200 por 100.000 habitantes. Los pacientes con IBD se pueden dividir en dos grupos principales, los que padecen colitis ulcerosa ("UC") y los que padecen enfermedad de Crohn ("CD").

En pacientes con UC, existe una reacción inflamatoria que implica principalmente a la mucosa del colon. Por lo general, la inflamación es uniforme y continua sin áreas de intervención de la mucosa normal. Las células de la mucosa superficial, así como el epitelio y la submucosa de la cripta intestinal están implicadas en una reacción inflamatoria con infiltración de neutrófilos. En última instancia, esta situación por lo general evoluciona a daño epitelial con pérdida de células epiteliales que da como resultado múltiples ulceraciones, fibrosis, displasia y retracción longitudinal del colon.

65

La CD se diferencia de la UC en que la inflamación se extiende a través de todas las capas de la pared intestinal e implica al mesenterio así como a los nódulos linfáticos. La CD puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo desde la boca al ano. A menudo, la enfermedad es discontinua, es decir, segmentos gravemente dañados del intestino están separados de las zonas aparentemente libres de enfermedad. En la CD, la pared del intestino también se engrosa lo que puede conducir a obstrucciones. Además, las fístulas y las fisuras son bastante frecuentes.

Clínicamente, el IBD se caracteriza por diversas manifestaciones que a menudo como resultado una evolución crónica, impredecible. A menudo, una diarrea sanguinolenta y dolor abdominal van acompañados con fiebre y pérdida de peso. La anemia es habitual, al igual que la fatiga severa. Normalmente, con el IBD van asociadas manifestaciones articulares que varían desde artralgia a artritis aguda, así como anomalías en la función hepática. Algunos pacientes con IBD también tienen un aumento del riesgo de carcinomas de colon en comparación con la población general. Durante los "ataques" agudos del IBD, el trabajo y otras actividades normales normalmente son imposibles, y a menudo hay que hospitalizar al paciente.

Aunque la causa del IBD sigue siendo desconocida, se han visto implicados varios factores tales como la susceptibilidad genética, infecciosa e inmunológica. El IBD es mucho más común en los individuos de raza blanca, especialmente en los de ascendencia judía. La naturaleza inflamatoria crónica de la afección ha provocado una intensa búsqueda de una posible causa infecciosa. Aunque se han encontrado algunos agentes que estimulan la inflamación aguda, no se ha encontrado ninguno que causa la inflamación crónica asociada al IBD. La hipótesis de que IBD es una enfermedad autoinmune está apoyada por la manifestación extraintestinal de IBD mencionada anteriormente como artritis articular, y la respuesta positiva a IBD conocida por tratamiento con agentes terapéuticos tales como glucocorticoides adrenales, ciclosporina y azatioprina, que se sabe que suprimen la respuesta inmune. Además, el tracto GI, más que cualquier otro órgano del organismo, está expuesto continuamente a sustancias antigénicas potenciales tales como proteínas de los alimentos, subproductos bacterianos (LPS), etc.

Además, el riesgo de cáncer de colon es muy elevado en pacientes con colitis ulcerosa grave, en particular si la enfermedad ha existido durante varios años. Aproximadamente un 20-25 % de los pacientes con IBD requiere en ocasiones cirugía para extirpar el colon debido a hemorragia masiva, enfermedad crónica de visitante, perforación del colon, o riesgo de cáncer. En ocasiones, la cirugía también se realiza cuando otras formas de tratamiento médico fracasan o cuando los efectos secundarios de los esteroides u otros medicamentos ponen en peligro la salud del paciente. Dado que la cirugía es invasiva y altera radicalmente la vida, no es un régimen de tratamiento altamente deseable, y por lo general es el tratamiento de último recurso. Con el fin de entender mejor esta enfermedad y posiblemente tratarla, algunos experimentos determinaron que un gen se regula de forma positiva tanto en CD como en UC en comparación con el tejido normal.

A pesar de los avances identificados anteriormente en investigación de trastornos inmunes, hay una gran necesidad de agentes de diagnóstico y terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de un trastorno inmune en un mamífero y para reducir estos trastornos de forma eficaz. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es identificar y caracterizar un polipéptido que está sobreexpresado en diversas células inmunes, que está implicado en diversos trastornos inmunes y usar ese polipéptido, y los ácidos nucleicos que no codifican, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica de trastornos inmunes en mamíferos.

## Sumario de la invención

### A. Realizaciones

La presente invención se refiere a composiciones y métodos sutiles para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el sistema inmune en mamíferos, incluyendo seres humanos tal como se define en las reivindicaciones. El tratamiento una enfermedad de este tipo también se describe en el presente documento. La presente invención se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) que son un resultado de la estimulación de la respuesta inmune en mamíferos. Algunas enfermedades relacionadas con el sistema inmune se pueden tratar mediante la supresión o potenciación de la respuesta inmune. Algunas moléculas que aumentan la respuesta inmune estimulan o potencian la respuesta inmune a un antígeno. Algunas moléculas que estimulan la respuesta inmune se pueden usar de forma terapéutica cuando el aumento de la respuesta inmune podría ser beneficioso. De forma alternativa, algunas moléculas que suprimen la respuesta inmune atenúan o reducen la respuesta inmune a un antígeno (por ejemplo, anticuerpos de neutralización) se pueden usar de forma terapéutica cuando la atenuación de la respuesta inmune podría ser beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los polipéptidos PRO87299, agonistas y antagonistas de los mismos también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune e inflamatorias. En un aspecto específico, tales medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido PRO87299, agonista o antagonista del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la mezcla es estéril.

En el presente documento se describe un método para identificar agonistas o antagonistas para un polipéptido PRO87299 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO87299 con una molécula candidata y controlar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO87299. Preferentemente, el polipéptido PRO87299 es un polipéptido PRO87299 de secuencia nativa. En un aspecto específico, el agonista o antagonista de PRO87299 es un anticuerpo anti-PRO87299.

En una realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido PRO87299 o un anticuerpo que se une al polipéptido en mezcla con un vehículo o excipiente tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o anticuerpo. Cuando la composición comprende una molécula que estimula el sistema inmune, la composición es útil para: (a) aumentar la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero con necesidad de lo mismo, (b) estimular o potenciar una respuesta inmune en un mamífero con necesidad de lo mismo, (c) aumentar la proliferación de células inmunes en un mamífero con necesidad de la misma como respuesta a un antígeno, (d) estimular la actividad de las células inmunes o (e) aumentar la permeabilidad vascular. Cuando la composición comprende una molécula que inhibe el sistema inmune, la composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero con necesidad de lo mismo, (b) inhibir o reducir una respuesta inmune en un mamífero con necesidad de lo mismo, (c) disminuir la actividad de las células inmunes o (d) disminuir la proliferación de las células inmunes en un mamífero con necesidad de la mismo como respuesta a un antígeno. En otro aspecto, la composición comprende un principio activo adicional, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferentemente, la composición es estéril.

En el presente documento se describe un método para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune en un mamífero con necesidad del mismo, que comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de un polipéptido PRO87299, un agonista del mismo, un antagonista del mismo. En un aspecto preferente, el trastorno relacionado con el sistema inmune se selecciona entre el grupo que consiste en: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune, enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepato biliares tales como hepatitis activa crónica autoinmune infecciosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad intestinal inflamatoria, enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas mediadas por el sistema autoinmune o inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante, incluyendo rechazo a injerto y enfermedad de injerto contra hospedador.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une de forma específica a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o que se describen a continuación como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo de una sola cadena. En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado se une a un polipéptido PRO87299. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que tiene preferentemente restos de región que determina la complementariedad (CDR) y restos de región marco conservada (FR) humana. El anticuerpo se puede etiquetar o se puede inmovilizar en un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de una sola cadena, o un anticuerpo anti-idiotípico.

Además, en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PRO87299 en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Preferentemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica, que se puede conservar para conseguir prolongar la estabilidad del almacenamiento. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo de una sola cadena.

En el presente documento también se escribe un artículo de fabricación, que comprende:

- (a) una composición de materia que comprende un polipéptido PRO87299 o agonista o antagonista del mismo;
- (b) un envase que contiene dicha composición; y
- (c) una etiqueta fijada a dicho envase, o un prospecto incluido en dicho envase que hace referencia al uso de dicho polipéptido de PRO87299 o agonista o antagonista del mismo en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmune. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido PRO87299 o el agonista o antagonista del mismo.

Además, en otra realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO87299 (a) en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b)

en una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular, en la que un nivel de expresión más elevado en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica la presencia de enfermedad relacionada con el sistema inmune en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo, como se define en las reivindicaciones.

5 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad inmune en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO87299 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido PRO87299, en la muestra de ensayo; en el que la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia o ausencia de dicha enfermedad como se define en las reivindicaciones. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa, y se puede realizar en comparación con el control de la formación de complejos en una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular. Una cantidad de complejos mayor formada en la muestra de ensayo indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmune en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo. El anticuerpo lleva preferentemente una etiqueta detectable. La formación de complejos se puede controlar, por ejemplo, mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. Normalmente, la muestra de ensayo se obtiene de un individuo del que se sospecha que tiene una deficiencia o anomalía del sistema inmune.

20 En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la presencia de un polipéptido PRO87299 en una muestra que comprende exponer una muestra de ensayo de células de las que se sospecha que contienen el polipéptido PRO87299 a un anticuerpo anti-PRO87299 y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra celular como se define en las reivindicaciones. La muestra comprende una célula de la que se sospecha que contiene el polipéptido PRO87299 y el anticuerpo se une a la célula. El anticuerpo está preferentemente etiquetado y/o unido a un soporte sólido.

25 En el presente documento también se describe un kit para diagnosticar enfermedades relacionadas con el sistema inmune, que comprende un anticuerpo anti-PRO87299 y un vehículo en un envase adecuado. El kit contiene preferentemente instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido PRO87299. Preferentemente el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

30 En el presente documento también se describe un kit de diagnóstico, que contiene un anticuerpo anti-PRO87299 en un envase adecuado. El kit contiene preferentemente instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar el polipéptido PRO87299.

35 Un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero puede comprender la detección de la presencia o ausencia de un polipéptido PRO87299 en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas de dicho mamífero, en la que la presencia o ausencia del polipéptido PRO87299 en dicha muestra de ensayo es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmune en dicho mamífero.

40 En el presente documento se describe un método para identificar un agonista de un polipéptido PRO87299 que comprende:

- 45 (a) poner en contacto células y un compuesto de ensayo a identificar sistemáticamente en condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO87299; y  
(b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de ensayo es un agonista eficaz, en el que la inducción de dicha respuesta celular es indicativa de que dicho compuesto de ensayo es un agonista eficaz.

50 En el presente documento se describe un método para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad de un polipéptido PRO87299 que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido PRO87299 en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen y determinar si se inhibe la actividad del polipéptido PRO87299. En un aspecto específico, cualquiera del compuesto candidato o el polipéptido PRO87299 se inmoviliza en un soporte sólido. En otro aspecto, el componente no inmovilizado lleva una etiqueta detectable. En un aspecto preferente, este método comprende las etapas de:

- 55 (a) poner en contacto células y un compuesto de ensayo a identificar sistemáticamente en presencia de un polipéptido PRO87299 en condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO87299; y  
60 (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de ensayo es un antagonista eficaz.

En el presente documento se describe un método para identificar un compuesto que inhibe la expresión de un polipéptido PRO87299 en células que expresan normalmente el polipéptido, en el que el método comprende poner en contacto las células con un compuesto de ensayo y determinar si se inhibe la expresión del polipéptido PRO87299. En un aspecto preferente, este método comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto células y un compuesto de ensayo a identificar sistemáticamente en condiciones adecuadas para permitir la expresión del polipéptido PRO87299; y
- (b) determinar la inhibición de la expresión de dicho polipéptido.

5 En el presente documento también se describe un método para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune en un mamífero que lo padece que comprende la administración al mamífero de una molécula de ácido nucleico que codifica a cualquiera de (a) un polipéptido PRO87299, (b) un agonista de un polipéptido PRO87299 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO87299, en el que dicho agonista o antagonista puede ser un anticuerpo anti-PRO87299. En un ejemplo preferente, el mamífero es humano. En otro ejemplo preferente, el ácido nucleico se administra a través de terapia genética *ex vivo*. En un ejemplo preferente adicional, el ácido nucleico está comprendido dentro de un vector, más preferentemente un vector adenoviral, viral adeno-asociado, lentiviral o retroviral.

15 En el presente documento se describe una partícula viral recombinante que comprende un vector viral que consiste básicamente en un promotor, ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO87299, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO87299, o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO87299, y una secuencia señal para secreción celular del polipéptido, en el que el vector viral en asociación con proteínas estructurales virales. Preferentemente, la secuencia señal es de un mamífero, tal como de un polipéptido PRO87299 nativo.

20 En el presente documento se describe una célula productora *ex vivo* que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa proteínas estructurales retrovirales y también comprende un vector retroviral que consiste básicamente en un promotor, ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO87299, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO87299 o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO87299, y una secuencia señal para secreción celular del polipéptido, en la que dicha célula productora empaqueta el vector retroviral en asociación con las proteínas estructurales para producir partículas retrovirales recombinantes.

25 En el presente documento también se describe un método para aumentar la actividad de las células inmunes en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO87299, (b) un agonista de un polipéptido PRO87299, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO87299, en el que la actividad de las células inmunes en el mamífero aumenta;

30 un método para aumentar la proliferación de células inmunes en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO87299, (b) un agonista de un polipéptido PRO87299, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO87299, en el que la proliferación de células inmunes en el mamífero aumenta; y

35 un método para disminuir la proliferación de células inmunes en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO87299, (b) un agonista de un polipéptido PRO87299, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO87299, en el que la proliferación de células inmunes en el mamífero disminuye.

#### B. Realizaciones Adicionales

40 En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifican cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones. También se proporciona cualquier célula hospedadora que comprende cualquier vector de este tipo como se define en las reivindicaciones. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli*, o levadura. Además, se proporciona un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento como se define en las reivindicaciones y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

50 En otras realizaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionado con un polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos como se define en las reivindicaciones. Algunos ejemplos de moléculas quiméricas de este tipo comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionado con una secuencia de etiqueta de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

55 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une de forma específica a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o que se describen a continuación como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo de una sola cadena.

60 En el presente documento también se describen sondas de oligonucleótido útiles para aislar secuencias de nucleótidos genómicas y de ADNc o como sondas antisentido, en las que esas sondas se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente o que se describen a continuación.

En otras realizaciones, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO87299 como se define en las reivindicaciones.

65 Una molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 80 %, como alternativa, una identidad de secuencias



aproximadamente un 92 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 93 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 94 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 95 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 96 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 97 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 98 % y como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 99 % con una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro como se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO87299 que tiene supresión de dominio transmembrana o inactivación de dominio transmembrana, o es complementario con la secuencia de nucleótidos de codificación, en el que el dominio o dominios transmembrana de tal polipéptido se desvelan en el presente documento. Por lo tanto, se contemplan dominios extracelulares solubles de los polipéptidos PRO87299 descritos en el presente documento.

Los fragmentos de una secuencia de codificación del polipéptido PRO87299, o el complemento del mismo, pueden encontrar uso como, por ejemplo, sondas de hibridación, para codificar fragmentos de un polipéptido PRO87299 que pueden codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO87299 o como sondas de oligonucleótido antisentido. Tales fragmentos de ácido nucleico normalmente tienen una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente un 50 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 70 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 80 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 90 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente un 100 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 110 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 120 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 130 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 140 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 150 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 160 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 170 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 180 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 190 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 200 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 250 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 300 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 350 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 400 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 450 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 500 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 600 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 700 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 800 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 900 nucleótidos y como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 1000 nucleótidos, en los que, en este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a la longitud de la secuencia de nucleótidos mencionada más o menos un 10 % de esa longitud mencionada. Se observa que los nuevos fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO87299 se pueden determinar de una manera de rutina mediante alineación de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO87299 con otras secuencias de nucleótidos conocidas usando cualquiera de un número de programas de alineamiento de secuencias conocidos y determinando que fragmento o fragmentos de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO87299 son nuevos. En el presente documento se contemplan todas las secuencias de nucleótidos de este tipo que codifican el polipéptido PRO87299. También se contemplan los fragmentos del polipéptido PRO87299 codificados por estos fragmentos de molécula de nucleótido, preferentemente los fragmentos del polipéptido PRO87299 que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO87299.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido PRO87299 aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente en el presente documento como se define en las reivindicaciones.

Un polipéptido PRO87299 aislado, puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 81 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 82 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 83 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 84 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 85 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 86 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 87 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 88 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 89 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos

aproximadamente un 90 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 91 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 92 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 93 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
5 aproximadamente un 94 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 95 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 96 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 97 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 98 % y como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
10 aproximadamente un 99 % con un polipéptido PRO87299 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento o cualquier otro fragmento definido de forma específica de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se desvela en el presente documento.

15 Un polipéptido PRO87299 aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 81 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 82 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
20 aproximadamente un 83 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 84 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 85 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 86 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
25 aproximadamente un 87 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 88 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 89 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 91 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
30 aproximadamente un 92 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 93 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 94 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 95 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 96 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
35 aproximadamente un 97 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 98 % y como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 99 % con una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

40 En un aspecto específico, la invención proporciona un polipéptido PRO87299 aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de inicio y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de aminoácidos como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En el presente documento también se describen procesos para producir al mismo, en el que esos procesos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de codificación apropiada en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido PRO87299 y recuperar el polipéptido PRO87299 del cultivo celular.

45 Otro aspecto de la invención proporciona un polipéptido PRO87299 aislado que tiene supresión de dominio transmembrana o inactivación de dominio transmembrana. En el presente documento también se describen procesos para producir al mismo, en el que de sus procesos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de codificación apropiada en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido PRO87299 y recuperar el polipéptido PRO87299 del cultivo celular.

50 En el presente documento se describen agonistas y antagonistas de un polipéptido PRO87299 nativo como se define en el presente documento. En un ejemplo en particular, el agonista o antagonista es un anticuerpo anti-PRO87299 o una molécula pequeña.

55 En el presente documento también se describe un método para identificar agonistas o antagonistas para un polipéptido PRO87299 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO87299 con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO87299. Preferentemente, el polipéptido PRO87299 es un polipéptido PRO87299 nativo.

60 Además, en otra realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido PRO87299, o un anticuerpo anti-PRO87299, en combinación con un vehículo como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 En el presente documento también se describe el uso de un polipéptido PRO87299, o un agonista o antagonista del mismo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o un anticuerpo anti-PRO87299, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al polipéptido PRO87299, un

agonista o antagonista del mismo o un anticuerpo anti-PRO87299.

### Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un ADNc de PRO87299 de secuencia nativa, en la que la SEQ ID NO: 1 es un clon denominado "DNA332467" en el presente documento.  
La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: mostrada en la Figura 1.

### 10 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

#### I. Definiciones

- 15 Los polipéptidos PRO87299 descritos en el presente documento se pueden aislar a partir de diversas fuentes, tales como a partir de tipos de tejido humano o de otra fuente, o se pueden preparar mediante métodos recombinantes o de síntesis. Todas las divulgaciones de la presente memoria descriptiva que se refieren al "polipéptido PRO87299" hacen referencia a cada uno de los polipéptidos de forma individual así como de forma conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, derivación de, formación de anticuerpos para o frente a, administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., pertenecen a cada  
20 polipéptido de la invención de forma individual. La expresión "polipéptido PRO87299" también incluye variantes de los polipéptidos PRO87299 desvelados en el presente documento.

- Un "polipéptido PRO87299 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PRO87299 correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos PRO87299  
25 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir con medios recombinantes o de síntesis. La expresión "polipéptido PRO87299 de secuencia nativa" incluye de forma específica formas truncadas o secretadas de origen del polipéptido PRO87299 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. En diversas realizaciones de invención con los polipéptidos PRO87299 de secuencia nativa desvelados en el presente documento son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras adjuntas. Los codones de inicio y parada se muestran en letra y subrayados en las figuras. Sin embargo, aunque se muestra que los polipéptidos PRO87299 desvelados en las figuras adjuntas comienzan con restos de metionina denominados en el presente documento posición 1 del aminoácido en las figuras, es concebible y posible que otros restos de metionina  
30 situados ya sea cadena arriba o cadena debajo de la posición 1 del aminoácido en las figuras se puedan usar como el resto de aminoácido de partida para los polipéptidos PRO87299.

- El "dominio extracelular" del polipéptido PRO87299 o "ECD" se refiere a una forma del polipéptido PRO87299 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático. De forma habitual, un ECD del polipéptido  
40 PRO87299 tendrá menos de un 1 % de tales dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferentemente, tendrá menos de un 0,5 % de tales dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO87299 de la presente invención se identifica siguiendo criterios usados de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar pero lo más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se ha  
45 identificado inicialmente en el presente documento. Por lo tanto, de forma opcional, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299 puede contener de aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del límite del dominio transmembrana/dominio extracelular como se identifica en los Ejemplos o memoria descriptiva y tales polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

- 50 "Variante del polipéptido PRO87299" se refiere a un polipéptido PRO87299 activo como se ha definido anteriormente o se define a continuación que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 % con una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO87299 que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se desvela en el presente documento. Tales variantes de polipéptido PRO87299 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO87299 en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden, o se suprimen, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. De forma habitual, una  
60 variante del polipéptido PRO87299 tendrá una identidad secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 80 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 81 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 82 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 83 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 84 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 85 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos aproximadamente un 86 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
65

aproximadamente un 87 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 88 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 89 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 90 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
5 aproximadamente un 91 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 92 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 93 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 94 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 95 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
10 aproximadamente un 96 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 97 %, como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 98 % y como alternativa, una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos  
aproximadamente un 99 % con respecto a una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud  
completa como se desvela en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO87299 que carece del  
15 péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con  
o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento o cualquier otro fragmento definido de forma  
específica de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se desvela en el presente  
documento. De forma habitual, los polipéptidos variantes de PRO87299 tienen una longitud de al menos  
aproximadamente 10 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 20 aminoácidos,  
20 como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 30 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al  
menos aproximadamente 40 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 50  
aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 60 aminoácidos, como alternativa, una  
longitud de al menos aproximadamente 70 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos  
aproximadamente 80 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 90 aminoácidos,  
25 como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 100 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al  
menos aproximadamente 150 aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 200  
aminoácidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 300 aminoácidos, o superior.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a las secuencias del polipéptido  
30 PRO87299 identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una  
secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia específica del polipéptido  
PRO87299, después de alineamiento de las secuencias e introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir  
el porcentaje máximo de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativas como parte de  
la identidad de la secuencia. El alineamiento, para fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias  
35 de aminoácidos, se puede conseguir diversas maneras que están dentro de la experiencia en la materia, por  
ejemplo, usando software informático disponible al público tal como los software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign  
(DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento,  
incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir un alineamiento máximo con respecto a la longitud completa  
de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, para fines del presente documento, un % de valores de  
40 identidad de secuencias de aminoácidos se genera usando el programa informático de comparación de secuencias  
ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 que sigue a  
continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el  
código fuente mostrado en la Tabla 1 que sigue a continuación se ha presentado con documentación del usuario en  
la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en la que se registró con el número de  
45 Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos n.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a  
través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede recopilar a partir del código fuente  
proporcionado en la Tabla 1 que sigue a continuación. El programa ALIGN-2 se debería recopilar para uso en un  
sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias  
se ajustan con el programa ALIGN-2 y no varían.

50 En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de  
secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con, o frente a una secuencia de  
aminoácidos B dada (que de forma alternativa se puede denominar como una secuencia de aminoácidos A dada que  
tiene o que comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos para, con, o frente a una secuencia de  
55 aminoácidos B) dada se calcula como sigue a continuación:

100 veces la fracción X/Y

60 en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas con el programa de  
alineamiento de secuencias, ALIGN-2, en ese alineamiento de A y B del programa, y en la que Y es el número total de  
restos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no tiene una longitud  
igual a la de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B  
no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos de  
% de identidad de secuencias de aminoácidos que usan este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el  
65 % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de  
Comparación" con respecto a la secuencia de aminoácidos denominada "PRO87299", en la que "PRO87299"

representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO87299 hipotético de interés, "Proteína de Comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al que se está comparando el polipéptido "PRO87299" de interés, y cada uno de "X", "Y" y "Z" representa diferentes restos de aminoácidos hipotéticos.

5 A menos que se indique de forma específica de otro modo, todos los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, algunos valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos también se pueden obtener como se describe a continuación usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen a los valores por defecto. Los valores no ajustados a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores: lapso de superposición = 1, fracción de superposición = 0.125, umbral de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de restos de aminoácidos idénticos con coincidencias entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO87299 de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido PRO87299 nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se está comparando el polipéptido PRO87299 un polipéptido variante de PRO87299) como se determina con WU-BLAST-2 entre (b) el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO87299 de interés. Por ejemplo, en la expresión "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que posee o que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 % con la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO87299 de interés.

El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos también se puede determinar usando del programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> se puede obtener de otro modo del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos de esos parámetros de búsqueda se ajustan a valores por defecto que incluyen, por ejemplo, sin enmascarar = si, cadena = todos, apariciones esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor e de múltiples pases = 0,01, constante para múltiples pases = 25, disminución para alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada para, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que como alternativa se puede denominar secuencia de aminoácidos A que tiene o que comprende un cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, para, o frente a una secuencia de aminoácidos B) dada se calcula como sigue a continuación:

100 veces la fracción X/Y

40 en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas con el programa de alineamiento de secuencias, NCBI-BLAST2, en ese alineamiento de A y B del programa, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no tiene una longitud igual a la de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

"Polinucleótido variante de PRO87299" o "secuencia de ácidos nucleicos variante de PRO87299" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO87299 activo como se define a continuación y que tiene una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 80 % con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con o sin el péptido señal, como se desvela en el presente documento o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se desvela en el presente documento. De forma habitual, un polinucleótido variante de PRO87299 tendrá una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 80 %, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 81 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 82 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 83 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 84 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 85 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 86 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 87 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 88 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 89 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 90 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 91 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos

aproximadamente un 92 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 93 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 94 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 95 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 96 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 97 %, como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 98 % y como alternativa, una identidad de secuencias de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente un 99 % con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa como se desvela en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se desvela en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con o sin la secuencia señal, como se desvela en el presente documento o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se desvela en el presente documento. Algunas variantes no incluyen la secuencia de nucleótidos nativa.

De forma habitual, los polinucleótidos variantes de PRO87299 tienen de una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 90 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 120 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 150 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 180 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 210 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 240 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 270 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 300 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 450 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 600 nucleótidos, como alternativa, una longitud de al menos aproximadamente 900 nucleótidos, o superior.

" Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a secuencias de ácidos nucleicos que codifican PRO87299 en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de PRO87299 de interés, después de alineamiento de las secuencias e introducción de huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencias. El alineamiento, para fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, se puede conseguir diversas maneras que están dentro de la experiencia en la materia, por ejemplo, usando software informático disponible al público tal como los software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, para fines del presente documento, un % de valores de identidad de secuencias de ácidos nucleicos se genera usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 que sigue a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 que sigue a continuación se ha presentado con documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en la que se registró con el número de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos n.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede recopilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 que sigue a continuación. El programa ALIGN-2 se debería recopilar para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan con el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos C dada para, con, o frente a una secuencia de aminoácidos D dada (que como alternativa se puede denominar secuencia de ácidos nucleicos C que tiene o que comprende un cierto % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con, para, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D) dada se calcula como sigue a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

en la que W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas con el programa de alineamiento de secuencias, ALIGN-2, en ese alineamiento de C y D del programa, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no tiene una longitud igual a la de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5, demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de Comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos denominada " ADN de PRO87299", en la que "ADN de PRO87299" representa una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de PRO87299 hipotética de interés, "ADN de Comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que se está comparando la molécula de ácido nucleico de "ADN de PRO87299" de interés, y cada uno de "N", "L" y "V" representa diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que se indique de forma específica de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando un programa informático ALIGN-2. Sin embargo, el % de valores de identidad de secuencias de ácidos nucleicos también se puede obtener como se describe a continuación usando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda con WU-BLAST-2 se ajustan a los valores por defecto. Los que no se ajustan a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores: lapso de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un % de valor de identidad de secuencias de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos con coincidencia entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO87299 de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO87299 de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se está comparando la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO87299 de interés que puede ser un polinucleótido de PRO87299 variante) como se determina con WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO87299 de interés. Por ejemplo, en la expresión "una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que posee o que tiene una identidad de secuencias de ácido nucleico de al menos un 80 % con la secuencia de ácidos nucleicos B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico del polipéptido PRO87299 de interés.

El porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o de otro modo obtener del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en el que todos esos parámetros de búsqueda se ajustan a valores por defecto que incluyen, por ejemplo, sin enmascarar = si, cadena = todos, apariciones esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor e de múltiples pases = 0,01, constante para múltiples pases = 25, disminución para alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos C dada para, con, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que de forma alternativa se puede denominar secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o que comprende un cierto % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos para, con, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D dada) se calcula como sigue a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

en la que W es el número nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas con el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en ese alineamiento de C y D del programa, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos de D con respecto a C.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de PRO87299 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO87299 activo y que son capaces de hibridarse, preferentemente en condiciones de hibridación rigurosa y de lavado, con secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO87299 de longitud completa como se desvela en el presente documento. Los polipéptidos variantes de PRO87299 pueden ser aquellos que están codificados con un polinucleótido variante de PRO87299.

"Aislado," cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento, se refiere a un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Algunos componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que por lo general interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros son brutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta homogeneidad con SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del entorno natural del polipéptido PRO87299 no estará presente. De forma habitual, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO87299 "aislado" u otro ácido nucleico que codifica polipéptido es una molécula de ácido nucleico que ésta identificar y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido aislado es distinta en la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptido se distingue de la

molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido específico ya que existen células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifica un polipéptido contenido en células que normalmente expresan el polipéptido en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

5 La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarios para la expresión de una secuencia de codificación unidas de forma operativa en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

15 El ácido nucleico está "unido de forma operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de un líder presecuencia o secretor está unido de forma operativa al ADN de un polipéptido si se expresa en una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia de codificación si influye en la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido de forma operativa a una secuencia de codificación si se coloca con el fin de facilitar la traducción. Por lo general, "unido de forma operativa" se refiere a que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguo y en fase de lectura. Sin embargo, algunos potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se consigue mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótido sintético de acuerdo con la práctica con.

25 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre de forma específica, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO87299 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, y neutralizantes), composiciones de anticuerpo anti-PRO87299 con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO87299 de una sola cadena, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO87299 (véase a continuación). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores.

30 La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación la puede determinar fácilmente un experto habitual en la materia, y por lo general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado, y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación por lo general depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para volverse a hibridar cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno con una temperatura inferior a su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia que se puede hibridar, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se deduce que las temperaturas relativas más elevadas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas más bajas menos. Para detalles y explicaciones adicionales de rigurosidad de reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

45 Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en el presente documento, se pueden identificar como las que: (1) usan fuerza iónica baja y temperatura elevada para lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) usan, durante la hibridación, 1 agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) usan formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

55 Las "condiciones moderadamente rigurosas" se pueden identificar como se describe Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida al 20 %, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. cuando sea necesario para admitir factores tales como longitud de sonda y similares.

65 La expresión "etiquetado con epítipo" cuando se usan el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO87299 fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos como para proporcionar un epítipo frente al que se puede preparar un anticuerpo, aunque es demasiado

corto de modo que no interfiere con la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta también es preferentemente casi único de modo que el anticuerpo básicamente no reacciona de forma cruzada con otros epítomos. Los polipéptidos etiqueta adecuados por lo general tienen al menos seis restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. De forma estructural, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta de la del reconocimiento del antígeno y sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina por lo general es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

"Activo" o "actividad" para los fines en el presente documento se refiere a forma(s) de un polipéptido PRO87299 que retienen una actividad biológica y/o una actividad inmunológica de PRO87299 nativo o de origen natural, en el que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibitoria o estimuladora) causada por un PRO87299 nativo o de origen natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítomo antigénico poseído por un PRO87299 nativo de origen natural y una actividad "inmunológica" se refiere la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítomo antigénico poseído por un PRO87299 nativo o de origen natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido PRO87299 nativo desvelado en el presente documento. De una manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido PRO87299 nativo desvelado en el presente documento. Algunas moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen de forma específica anticuerpos o fragmentos de anticuerpo agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos PRO87299 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Algunos métodos para identificar agonistas antagonistas de un polipéptido PRO87299 pueden comprender poner en contacto un polipéptido PRO87299 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido PRO87299.

"Tratamiento" se refiere tanto tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es evitar o reducir (disminuir) la afección o trastorno patológico que se tiene como diana. Los pacientes que tienen necesidad del tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a evitar el trasto.

Administración "crónica" se refiere a administración del agente(s) en un modo continuo en oposición a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que en su lugar es de naturaleza cíclica.

"Mamífero", para fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado con un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, deportes o mascotas, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (coincidente) y consecutiva en cualquier orden.

Los "vehículos" como se usan en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula buen mamífero que se está exponiendo a los mismos a las dosificaciones y concentraciones usadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptables es una solución acuosa de pH tamponado. Algunos ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes de quelación tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión o variable del antígeno del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab',

F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos de Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

5 La digestión anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento de F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígeno y que además es capaz de reticulación del antígeno.

10 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión de antígeno completo. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente, estrecha. En esta configuración es en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno con respecto al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que la de todo el sitio de unión.

15 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas a partir de la región bisagra del anticuerpo. En el presente documento, Fab'-SH es la denominación para el Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como padres de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

20 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos dominios constantes.

25 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2.

30 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de una sola cadena" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

35 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena del polipéptido (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Mediante el uso de un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

40 Un anticuerpo "aislado" es uno que sea identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Algunos componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los cursos de diagnóstico terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo tal como se determina de acuerdo con el método de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad con SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes dado que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De forma habitual, sin embargo con el anticuerpo aislado se preparará con al menos una etapa de purificación.

45 Un anticuerpo que "se une de forma específica a" o es "específico para" un polipéptido en particular o un epítipo en un polipéptido en particular es uno que se une a un polipéptido en particular o epítipo o en un polipéptido en particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

50 La expresión "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectables que está conjugado directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "etiquetado". La

etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

5 Por "fase sólida" se hace referencia a una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. En el presente documento, algunos ejemplos de fases sólidas incluyen las formadas parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas separadas, tal como las que se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 4.275.149.

15 Un "liposoma" es una vesícula pequeña formada por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para administrar un fármaco (tal como un polipéptido PRO87299 o anticuerpo del mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se colocan normalmente en una formación de bicapa, similar a la colocación del lípido de las membranas biológicas.

20 En el presente documento, se define una "molécula pequeña" que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Daltons.

25 La expresión "enfermedad relacionada con el sistema inmune" se refiere a una enfermedad en la que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media o de otro modo contribuye a una morbilidad en el mamífero. También están incluidas enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inmune tiene un efecto de mejora en la evolución de la enfermedad. Dentro de esta expresión están incluidas enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades por inmunodeficiencia, tumor maligno, etc.

30 La expresión "enfermedad mediada por linfocitos T" se refiere a una enfermedad en la que los linfocitos T median directa o indirectamente o de otro modo contribuyen a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por linfocitos T puede estar asociada a efectos mediados por células, efectos mediados por linfoquinas, etc., e incluso efectos asociados a linfocitos B si los linfocitos B están estimulados, por ejemplo, por las linfoquinas secretadas por los linfocitos T.

35 Algunos ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmune e inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por el sistema inmune o por linfocitos T, que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad intestinal inflamatoria (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas mediadas por el sistema autoinmune o inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante, incluyendo rechazo a injerto y enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedades infecciosas incluyen enfermedades virales tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D, y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones por protozoos y infecciones parasitarias.

55 La expresión "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO87299 y/o agonista/antagonista que da como resultado la consecución de una finalidad indicada en particular. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido PRO87299 o agonista o antagonista del mismo se puede determinar de forma empírica. Además, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO87299 y/o agonista/antagonista que es eficaz para conseguir un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad también se puede determinar de forma empírica.

65 La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup> y Re<sup>186</sup>), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), taxotere, metotrexato, 5 cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la Patente de Estados Unidos n.º 4.675.187), melfalán y otras mostaza de nitrógeno relacionadas. En esta definición también se incluyen agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores tales como tamoxifeno y onapristona.

Un "agente de inhibición del crecimiento", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente las células cancerosas que sobreexpresan cualquiera de los genes identificados en el presente documento, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente de inhibición del crecimiento es uno que reduce de forma significativa el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en fase S. Algunos ejemplos de agentes de inhibición del crecimiento incluyen agentes que bloquean la evolución del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la parada de G1 y la parada de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, y inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Esos agentes que paran a G1 también influyen en la parada de la fase S, por ejemplo, agentes de alquilación de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Alguna información adicional se puede encontrar en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes, y fármacos antineoplásicos" de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la p. 13.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otras células como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se están incluidas las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humano de N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona de estimulación de foliculo (FSH), hormona de estimulación tiroidea (TSH), y hormonal luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lacteógeno placentario; factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia de inhibición mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor I y II de crecimiento de tipo insulínico; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores de estimulación de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Como se usa en el presente documento, término "inmuno adhesina" designa molécula similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. De forma estructural, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión al antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina por lo general es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células inflamatorias" designa células que aumentan la respuesta inflamatoria tales como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos, y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

**Tabla 1**

```

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

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

```

**Tabla 1 (cont')**

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

**Tabla 1 (cont')**

```

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

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

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

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

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

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

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

```

**Tabla 1 (cont)**

```

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_calloc("to get coll", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                coll[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                coll[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            coll[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

**Tabla 1 (cont')**

...11W

```

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

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

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

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

```

**Tabla 1 (cont.)**

...nw

```

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

```

**Tabla 1 (cont.)**

```

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

#include "nw.h"

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

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

print()

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

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

```

**Tabla 1 (cont')**

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                  /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

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

```

**Tabla 1 (cont')**

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outh, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outh);

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

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int nn;          /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr\_align

**Tabla 1 (cont.)**

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = ' ';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
dumpblock
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

**...pr\_align**

**Tabla 1 (cont')****...dumpblock**

```

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

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[ ] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '\n')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '\n';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

**nums****putline**

Tabla 1 (cont')

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

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

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    stars

    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

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

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if ((lday && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0))
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

**Tabla 1 (cont.)**

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

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

**Tabla 1 (cont')**

```

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

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

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                   cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                             getseq
{
    char    *file;          /* file name */
    int     *len;          /* seq len */

    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

Tabla 1 (cont.)

...getseq

```

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

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
 */
readjmps()
readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = jen0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

g\_alloc

**Tabla 1 (cont´)****...readjumps**

```

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

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

**Tabla 1 (cont')**

```

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

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

```

**Tabla 2**

PRO87299	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de Comparación	XXXXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)
% de identidad de la secuencia de aminoácidos =		

(el número de restos de aminoácidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina con ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO87299) = 5 dividido entre 15 = 33,3 %

5

**Tabla 3**

PRO87299	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de Comparación	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)
% de identidad de la secuencia de aminoácidos =		

(el número de restos de aminoácidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina con ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO87299) = 5 dividido entre 10 = 50 %

**Tabla 4**

ADN de PRO87299	NNNNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de Comparación	NNNNNNLLLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)
% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =		

(el número de restos de nucleótidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina con ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del ADN de PRO87299) = 6 dividido entre 14 = 42,9 %

10

**Tabla 5**

ADN de PRO87299	NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de Comparación	NNNNLLLLVV (Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de restos de nucleótidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina con ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del ADN de PRO87299) = 4 dividido entre 12 = 33,3 %

II. Composiciones y Métodos de la Invención

A. Polipéptidos PRO87299 de Longitud Completa

5 La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican polipéptidos denominados polipéptidos PRO87299 en la presente solicitud como se define en las reivindicaciones. En particular, se han identificado y aislado algunos ADNc que codifican diversos polipéptidos PRO87299, como se desvela con más detalle en los Ejemplos que siguen a continuación.

10 Las secuencias de nucleótidos reales de esos clones las puede determinar fácilmente el experto en la materia mediante secuenciación del clon depositado usando métodos de rutina en la técnica. La secuencia de aminoácidos predicha se puede determinar a partir de la secuencia de nucleótidos usando experiencia de rutina. Para los polipéptidos PRO87299 y ácidos nucleicos de codificación descritos en el presente documento, los Solicitantes han identificado lo que se cree que es el marco de lectura que se puede identificar mejor con la información de la secuencia disponible en el momento.

B. Variantes del Polipéptido PRO87299

20 Además de los polipéptidos PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa descritos en el presente documento, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO87299. Algunas variantes de PRO87299 se pueden preparar mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO87299, y/o mediante síntesis del polipéptido PRO87299 deseado. Los expertos en la materia observarán que algunos cambios de aminoácidos pueden alterar procesos posteriores a la traducción del PRO87299, tales como cambio del número o posición de sitios de glicosilación o alteración de las características de anclaje a la membrana.

30 Algunas variaciones en la secuencia de PRO87299 de longitud completa nativa o en diversos dominios del PRO87299 descrito en el presente documento, se pueden realizar, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.364.934. Algunas variaciones pueden ser una sustitución, supresión o inserción de uno o más codones que codifican el PRO87299 que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO87299 en comparación con el PRO87299 de la secuencia nativa. Opcionalmente, la variación se realiza por sustitución de al menos un aminoácido con otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO87299. La guía para determinar que el resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o suprimir sin influir de forma adversa en la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia del PRO87299 con la de las moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos realizados en regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es decir, a sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o supresiones se pueden realizar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar mediante la realización de forma sistemática de inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a ensayo las variantes resultantes para actividad presentada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

45 En el presente documento se proporcionan fragmentos del polipéptido PRO87299. Tales fragmentos se pueden truncar en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO87299.

50 Los fragmentos de PRO87299 se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar por vía química. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de PRO87299 mediante digestión enzimática, por ejemplo, mediante tratamiento de la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos en particular, o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando del fragmento deseado. Además, otra

técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se usan en los cebadores en las posiciones 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos del polipéptido PRO87299 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con él polipéptido PRO87299 nativo desvelado en el presente documento.

En realizaciones en particular, en la Tabla 6 se muestran algunas sustituciones conservativas de interés bajo el título de sustituciones preferentes. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominado sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se identifican sistemáticamente.

Tabla 6

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

Algunas modificaciones sustanciales en función o identidad inmunológica del polipéptido PRO87299 se consiguen mediante la selección de sustituciones que se diferencian de forma significativa en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de sustitución, por ejemplo, como una conformación de la mina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobo: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilo neutro: cys, ser, thr;
- (3) ácido: asp, glu;
- (4) básico: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los

sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), rastreo con alanina, y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de casete [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis por selección de restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para producir el ADN variante de PRO87299.

- 10 El análisis aminoácidos con exploración se puede usar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia continua. Entre los aminoácidos de exploración preferentes se encuentran algunos aminoácidos neutros, pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. Por lo general, la alanina es un aminoácido de exploración preferente entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. Por lo general, la alanina también es preferente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones internas y expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chotia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

## 20 C. Modificaciones de PRO87299

En el presente documento se incluyen algunas modificaciones covalentes de PRO87299. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de restos de aminoácidos dirigidos de un polipéptido PRO87299 con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C-terminales del PRO87299. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticulación de PRO87299 a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en el método para purificar anticuerpos anti-PRO87299, y viceversa. Algunos agentes de reticulación usados normalmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes restos de glutamilo y aspártico, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, consolidación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina, y histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO87299 incluida en el presente documento comprende la alteración del patrón de glicosilación nativa del polipéptido. Para fines del presente documento, "alteración del patrón de glicosilación nativa" pretende hacer referencia a la supresión de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el de la secuencia PRO87299 nativa (ya sea por retirada del sitio de glicosilación subyacente o por supresión de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de PRO87299. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO87299 se puede conseguir mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia nativa de PRO87299 (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos PRO87299 se puede alterar opcionalmente a través de cambios al nivel del ADN, en particular mediante mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO87299 en bases seleccionadas previamente de modo que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidrato en el polipéptido PRO87299 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

La retirada de restos de carbohidratos presentes en el polipéptido PRO87299 se puede conseguir de forma química o de forma enzimática o mediante sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como dianas para glicosilación. En la técnica se conocen algunas técnicas de desglicosilación química y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y en Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos se puede conseguir mediante el uso de diversas endo- y exo-glicosidasas como se describe en Thotakura *et al.*, Met. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO87299 comprende la unión del polipéptido PRO87299 a uno de diversos

polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera que se expone en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

- 5 El PRO87299 de la presente invención también se debe modificar de una manera para formar una molécula quimérica que comprende PRO87299 fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

En una realización, una molécula quimérica de este tipo comprende una fusión del PRO87299 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que el anticuerpo anti-etiqueta se puede unir de forma selectiva. La etiqueta del epítipo por lo general se coloca en el extremo amino o carboxilo terminal del PRO87299. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del PRO87299 se pueden detectar usando un anticuerpo frente al polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el PRO87299 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítipo. En la técnica se conocen bien diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poly-histidina (poly-his) o poly-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido etiqueta de HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido de epítipo de alfa-tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y la etiqueta de péptido de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO87299 con una inmunoglobulina o una región de una inmunoglobulina en particular. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana suprimido o inactivado) de un polipéptido PRO87299 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.428.130 presentado el 27 de junio de 1995.

#### D. Preparación de PRO87299

35 La descripción que sigue a continuación se refiere principalmente a la producción de PRO87299 mediante cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO87299. Por supuesto, se contempla que para preparar PRO87299 se pueden usar algunos métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de PRO87299, o partes de la misma, se puede producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se prevé realizar usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando instrucciones del fabricante. Diversas partes del PRO87299 se pueden sintetizar químicamente por separado y combinar usando métodos químicos o enzimáticos para producir el PRO87299 de longitud completa.

45

##### 1. Aislamiento de ADN que codifica PRO87299

El ADN que codifica PRO87299 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido del que se cree que posee el ARNm de PRO87299 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO87299 humano se puede obtener de forma conveniente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO87299 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

55 Algunas bibliotecas se pueden identificar sistemáticamente con sondas (tales como anticuerpos para el PRO87299 u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. La identificación sistemática de la biblioteca de ADNc o genómico con las sondas seleccionadas se puede realizar usando procedimientos convencionales, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO87299 excusa metodología de PCR [Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

60

Los Ejemplos que siguen a continuación describen técnicas para identificar sistemáticamente una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían tener una longitud suficiente y lo suficientemente inequívocas como para que los pasos positivos se minimicen. El oligonucleótido está etiquetado preferentemente de modo que se puede detectar después hibridación con ADN en la biblioteca que se está

65

identificando sistemáticamente. En la técnica se conocen en algunos métodos de etiquetado, que incluyen el uso de radioetiquetas tales como ATP etiquetado con <sup>32</sup>P, biotilación o etiquetado enzimático. En Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, se proporcionan algunas condiciones de hibridación, incluyendo rigurosidad moderada y rigurosidad elevada.

5 Las secuencias identificadas en métodos de identificación sistemática de bibliotecas de este tipo se pueden comparar y alinear con otras secuencias depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de las secuencias (a cualquier nivel del aminoácido o nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica y como se describe en el presente documento.

15 El ácido nucleico que tiene secuencia de codificación de proteína se puede obtener mediante identificación sistemática de bibliotecas seccionadas de ADNc o genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida desvelada en el presente documento para la primera vez, y si fuera necesario, usando procedimientos de extensión de cebador convencionales como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, para detectar precursores y elementos intermedios de procesamiento de ARNm que se pueden haber transcrito de forma inversa uno en el ADNc.

## 20 2. Selección y Transformación de Células Hospedadoras

Las células hospedadoras y transfectadas se transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para producción de PRO87299 y se cultivan en medio de nutriente convencional modificado, cuando sea apropiado, para inducción de promotores, selección de transformantes, o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, las puede seleccionar el experto en la materia sin experimentación excesiva. En general, algunos principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

30 Los expertos habituales en la materia conocen algunos métodos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub>, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. Por lo general, el tratamiento de calcio usando cloruro cálcico, como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, o electroporación se usa para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para transformación de ciertas células vegetales, como se describe en Shaw *et al.*, Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede usar el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). Algunos aspectos generales de transfecciones de sistema de células hospedadoras de mamífero se han descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 4.399.216. Por lo general, las transformaciones en levadura se realizan de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir ADN en células, tal como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336: 348-352 (1988).

45 Algunas células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura, o eucariota superiores. Algunas células procariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están disponibles al público, tales como la cepa MM294 de K12 de *E. coli* (ATCC 31.446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador precursor particularmente preferente porque es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para que realice una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas con respecto al hospedador, con algunos ejemplos de tales hospedador es que incluyen la cepa 1A2 de W3110 de *E. coli*, que tiene el genotipo *tonA* completo; la cepa 9E4 de W3110 de *E. coli*, que tiene el genotipo *tonA ptr3* completo; la cepa 27C7 de W3110 de *E. coli* (ATCC 55.244), que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>* completo; la cepa 37D6 de W3110 de *E. coli*, que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>* completo; la cepa 40B4 de W3110 de *E. coli*, que es la cepa 37D6 con una mutación de supresión de *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la Patente de Estados Unidos n.º 4.946.783 presentar al 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados algunos métodos de

clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

Además de procariontas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO87299. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior usado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos n.º 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154 (2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). En el presente documento son adecuadas algunas levaduras metilotrópicas yee incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecimiento en metanol seleccionada entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son usadas a modo de ejemplo de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982).

Algunas células hospedadoras adecuadas para la expresión de PRO87299 glicosilado se derivan de organismos pluricelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrado incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Algunos ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster (CHO) y COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula hospedadora apropiada está dentro de la experiencia en la materia.

### 35 3. Selección y Uso de un Vector Replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica PRO87299 se puede insertar en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están disponibles al público. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en sitio o sitios apropiados de endonucleasa de restricción usando técnicas conocidas en la técnica. Algunos componentes del vector por lo general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia determinación de la transcripción. La construcción de algunos lectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes usa técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas por el experto en la materia.

El PRO87299 se puede producir de forma recombinante, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo the N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN que codifica PRO87299 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para secreción de levadura, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, algunas secuencias señal de mamífero se pueden usar para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie de especies relacionadas, así como líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias se conocen bien para diversas bacterias, levadura, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, y el origen del plásmido de 2 $\mu$  es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Algunos vectores de expresión y clonación por lo general contendrán un gen de selección, también denominado un

marcador seleccionable. Algunos genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministra nutrientes críticos no disponibles a partir del medio de complejo, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

5 Un ejemplo de marcadores adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico que codifica PRO87299, tales como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada, cuando se usa DHFR de tipo silvestre, usada es la línea de células CHO con déficit y actividad de DHFR, preparadas y propagadas como se describe en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216  
10 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

15 Algunos vectores de expresión y clonación por lo general contienen un promotor unido de forma operativa a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica PRO87299 para dirigir la síntesis del ARNm. Se conocen bien algunos promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. Algunos promotores adecuados para uso con hospedadores procariontes incluyen los sistemas de promotor de  $\beta$ -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281: 544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*)  
20 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Algunos promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida de forma operativa al ADN que codifica PRO87299.

25 Algunos ejemplos de secuencias de promoción adecuadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.  
30

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas a metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa. Algunos vectores y  
35 promotores adecuados para uso en expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

La transcripción de PRO87299 a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlado, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus de polio, virus de la viruela aviar (documento de patente UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus 40 de Simio (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.  
40

45 La transcripción de un ADN que codifica el PRO87299 mediante eucariotas superiores se puede aumentar mediante la inserción de una secuencia potenciada en el vector. Algunos potenciadores son elementos del ADN de acción cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias potenciadoras se conocen a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Por lo general, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el plazo tardío de la replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia de codificación de PRO87299, pero se sitúa preferentemente en la posición 5' del promotor.  
50

55 Algunos vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insecto, planta, animal, ser humano, o nucleadas de otros organismos pluricelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles normalmente a partir de las regiones sin traducir en la posición 5' y, en ocasiones en la posición 3', de los ADN o los ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte sin traducir del ARNm que codifica PRO87299.  
60

Además, otros métodos, vectores y células hospedadoras adecuadas para adaptación a la síntesis de PRO87299 en cultivo de células de vertebrado recombinantes se describen en Geting *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979); en el documento EP 117.060; y en el documento EP 117.058.

65 4. Detección de Amplificación/Expresión Genética

La amplificación y/o expresión genética se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia de Southern, transferencia de Northern convencionales para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente etiquetada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar algunos anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos se pueden etiquetar y el ensayo se puede realizar cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que después de la formación del dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Como alternativa, la expresión genética se puede medir con métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto genético. Algunos anticuerpos útiles para tinción y/o ensayo inmunohistoquímico de fluidos de muestra pueden ser bien monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos se pueden preparar frente a un polipéptido PRO87299 de secuencia nativa o frente a un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o frente a secuencia exógena fusionada a ADN de PRO87299 y codificando un epítipo de anticuerpo específico.

#### 5. Purificación de Polipéptido

Algunas formas de PRO87299 se pueden recuperar a partir del medio de cultivo o a partir de lisados de célula hospedadora. Si está unido a la membrana, éste se puede liberar de la membrana usando una solución de detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Algunas células usadas en la expresión de PRO87299 se pueden alterar mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica, o agentes del lisado celular.

Se puede desear la purificación de PRO87299 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos se usan a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para retirar contaminantes tales como IgG; y columnas de quelación con metal para unir formas etiquetadas con epítipo del PRO87299. Se pueden usar diversos métodos de purificación de proteína y tales métodos se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y del PRO87299 producido en particular.

#### E. Distribución de Tejido

La ubicación de los tejidos que expresan el PRO87299 se puede identificar mediante la determinación de la expresión del ARNm en diversos tejidos humanos. La ubicación de tales genes proporciona información aproximada sobre qué tejidos es más probable que se vean afectados por las actividades de estimulación e inhibición de los polipéptidos PRO87299. La ubicación de un gene en un tejido específico también proporciona tejido de muestra para los ensayos de bloqueo de actividad que se discuten a continuación.

Como se ha indicado anteriormente, la expresión genética en diversos tejidos se puede medir mediante transferencia de Southern, transferencia de Northern convencionales para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 [1980]), transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente etiquetada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar algunos anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

Como alternativa, la expresión genética se puede medir con métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto genético. Algunos anticuerpos útiles para tinción y/o ensayo inmunohistoquímico de fluidos de muestra pueden ser bien monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos se pueden preparar frente a una secuencia nativa de un polipéptido PRO87299 o frente a un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN que codifican el polipéptido PRO87299 o frente a secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido PRO87299 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico. A continuación se proporcionan algunas técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos especiales para transferencia de Northern e hibridación *in situ*.

#### F. Estudios de Unión a Anticuerpo

La actividad de los polipéptidos PRO87299 se puede verificar adicionalmente mediante estudios de unión de anticuerpo, en los que se somete a ensayo de la capacidad de los anticuerpos anti-PRO87299 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO87299, respectivamente, en células de tejido. Algunos anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados, cuya preparación se describirá en lo sucesivo en el presente documento.

Algunos estudios de unión de anticuerpo se pueden realizar en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Algunos ensayos de unión competitiva dependen totalmente de la capacidad de un patrón etiquetado para competir con el analito de la muestra de ensayo para unirse con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se llega a unir a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se llega a unir, los anticuerpos preferentemente se insolubilizan antes o después de la competición, de modo que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar de forma conveniente del patrón y analito que permanece sin unir.

Algunos ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido, y a partir de ese momento, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar unido por sí mismo a un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está etiquetado con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso, el resto detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser recién preparada o congelada o se puede embeber en parafina y fijar como conserva de tal como formalina, por ejemplo.

#### G. Ensayos Basados en Células

Se pueden usar ensayos basados en células y modelos animales para enfermedades relacionadas con el sistema inmune para comprender mejor la relación entre los genes y polipéptidos identificados en el presente documento y el desarrollo de patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

En un enfoque diferente, algunas células de un tipo celular conocido a implicar en una enfermedad relacionada con el sistema inmune en particular se transfectan con los ADNc descritos en el presente documento, y la capacidad de estos ADNc para estimular o inhibir la función inmune se analiza. Algunas células adecuadas se pueden transfectar con el gen deseado, y controlar para actividad de la función inmune. Tales líneas de células transfectadas se pueden usar a continuación para someter a ensayo la capacidad de anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpo para inhibir o estimular la función inmune, por ejemplo, para modular la proliferación de linfocitos T o infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias de codificación de los genes identificados en el presente documento se pueden usar adicionalmente para identificar candidatos a fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

Además, en el presente documento se pueden usar cultivos primarios derivados de animales transgénicos (como se describe a continuación) en los ensayos basados en células, aunque son preferentes las líneas de células estables. En la técnica se conocen bien algunas técnicas para derivar líneas de células continuas a partir de animales transgénicos (véase, por ejemplo, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5: 642-648 [1985]).

Un ensayo a base de células adecuado es la reacción linfocítica mixta (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unidad 3.12; editado por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc. En este ensayo, se somete a ensayo la capacidad de un compuesto de ensayo para estimular o inhibir la proliferación de linfocitos T activados. Una suspensión de los linfocitos T que presentan respuesta se cultiva con células estimulantes alogénicas y la proliferación de los linfocitos T se mide mediante la absorción de timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de los linfocitos T. Dado que la mayoría de los linfocitos T responden a y producen IL-2 después de activación, las diferencias de respuesta en este ensayo reflejan en parte algunas diferencias en la producción de IL-2 por las células que responden. Los resultados de MLR se pueden verificar mediante un ensayo convencional de detección de linfoquina (IL-2). *Current Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente, 3.15, 6.3.

Una respuesta de los linfocitos T proliferativos en un ensayo de MLR se puede deber a propiedades mitogénicas directas de una molécula sometida a ensayo o para activación inducida por antígeno externo. La activación de los linfocitos T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del receptor de linfocitos T (TCR) y una señal

coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión a ligando, por ejemplo, la interacción de unión a B7 (CD80, CD86)/CD28. La reticulación de CD28 aumentan la secreción de linfoquinas por los linfocitos T activados. La activación de los linfocitos T tiene controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la super familia de Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 tiene un efecto positivo de coestimulación de la activación de los linfocitos T; por el contrario, la unión de CTLA-4 a B7 tiene un efecto de desactivación de los linfocitos T. Chambers, C. A. y Allison, J. P., Curr. Opin. Immunol. (1997) 9: 396. Schwartz, R. H., Cell (1992) 71: 1065; Linsey, P. S. y Ledbetter, J. A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11: 191; June, C. H. *et al.*, Immunol. Today (1994) 15: 321; Jenkins, M. K., Immunity (1994) 1: 405. En un ensayo de coestimulación, los polipéptidos PRO87299 se someten a ensayo para actividad de coestimulación o inhibición de linfocitos T.

El uso directo de un compuesto estimulante como en la invención se ha validado en experimentos con glicoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en linfocitos T cebados y señales de activación y crecimiento de los linfocitos T. Alderson, M. E. *et al.*, J. Immunol. (1994) 24: 2219.

El uso de un compuesto estimulante agonista también se ha validado de forma experimental. La activación de 4-1BB mediante tratamiento con un anticuerpo anti-4-1BB agonista aumenta la erradicación de tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, K. E., Crit. Rev. Immunol. (1998) 18: 1. La terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores, que se describe con más detalle a continuación, es otro ejemplo del uso de los compuestos estimulantes de la invención.

Como alternativa, un efecto de estimulación o potenciación inmune también se puede conseguir mediante la administración de un PRO87299 que tiene propiedades de aumento de la permeabilidad vascular. El aumento de la permeabilidad vascular sería beneficioso para trastornos que se pueden atenuar mediante infiltración local de células inmunes (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, PMN) e inflamación.

Por otro lado, los polipéptidos PRO87299, así como otros compuestos de la invención, que son inhibidores directos de la proliferación/inhibición de los linfocitos T, secreción de linfoquinas, y/o permeabilidad vascular se pueden usar directamente para suprimir la respuesta inmune. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de respuesta inmune y para tratar enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una respuesta interactiva, superóptima, o autoinmune. Este uso de los compuestos de la invención se ha validado con los experimentos descritos anteriormente en los que la unión de CTLA-4 al receptor B7 desactivan los linfocitos T. Los compuestos inhibidores directos de la invención funciona de una manera análoga. Sería de esperar que el uso del compuesto que suprime la permeabilidad vascular redujera la inflamación. Tales usos serían beneficiosos en el tratamiento de afecciones asociadas a una inflamación excesiva.

Como alternativa, algunos compuestos, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a los polipéptidos PRO87299 estimulantes y bloquean el efecto estimulante de estas moléculas producen un efecto inhibitor neto y se pueden usar para suprimir la respuesta inmune mediada por los linfocitos T mediante la inhibición de la proliferación/activación de los linfocitos T y/o secreción de linfoquinas. El bloqueo del efecto estimulante de los polipéptidos suprime la respuesta inmune del mamífero. Este uso se ha validado en experimentos que usan un anticuerpo anti-IL2. En estos experimentos, el anticuerpo se une a IL2 y bloquea la unión de IL2 a sus receptor consiguiendo de este modo un efecto inhibitor de los linfocitos T.

#### H. Modelos Animales

Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células se pueden verificar adicionalmente usando modelos animales *in vivo* y ensayos para función de linfocitos T. Se puede usar diversos modelos animales bien conocidos para comprender adicionalmente el papel de los genes identificados en el presente documento en el desarrollo de patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, y para someter a ensayo la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace predictivos de respuestas en pacientes humanos. Algunos modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Algunos modelos de animal no recombinante incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos de murino. Tales modelos se pueden generar mediante la introducción de células en ratones singeneicos usando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la arena de la cola, implante en el bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

La enfermedad de injerto contra hospedador se produce cuando las células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a antígenos hospedadores. La respuesta puede variar desde inflamación grave que pone en peligro la vida a casos leves de diarrea y pérdida de peso. Algunos modelos de enfermedad de injerto contra hospedador proporcionan un medio para evaluar la reactividad de los linfocitos T frente a antígenos de MHC y antígenos de trasplante menores. Un procedimiento adecuado se describe con detalle en Current Protocols in Immunology, mencionado anteriormente, unidad 4.3.

Un modelo animal de rechazo a aloinjerto es un medio para someter a ensayo la capacidad de los linfocitos T para mediar la destrucción tisular *in vivo* y una medida de su papel en el rechazo al trasplante. Los modelos más comunes aceptados usan injertos de piel de cola de murino. Algunos experimentos repetidos han mostrado que el rechazo al aloinjerto de piel está mediado por los linfocitos T, linfocitos T auxiliares y linfocitos T efectores citotóxicos, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Un procedimiento adecuado se describe con detalle en *Current Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo a trasplante que se pueden usar para someter a ensayos los compuestos de la invención son los modelos de trasplante de corazón alogeneicos descritos en Tanabe, M. *et al*, *Transplantation* (1994) 58: 23 y Tinubu, S. A. *et al*, *J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

Algunos modelos animales para hipersensibilidad de tipo retardado proporcionan también un ensayo de función inmune mediada por células. Algunas reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado son una respuesta inmune *in vivo* mediada por linfocitos T caracterizada por inflamación que no alcanza un máximo hasta después de haber transcurrido un periodo de tiempo después de la estimulación con un antígeno. Estas reacciones también se producen en enfermedades autoinmunes específicas de tejido tales como esclerosis múltiple (EM) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para EM). Un procedimiento adecuado se describe con detalle en *Current Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente, unidad 4.5.

La EAE es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T caracterizada por inflamación de linfocitos T y células mononucleares y posterior desmielinización de axones en el sistema nervioso central. Por lo general, se considera que la EAE es un modelo animal relevante para EM en seres humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1: 143. Se han desarrollado modelos tanto agudos como de recidiva-remisión. Los compuestos de la invención se pueden someter al ensayo para actividad de estimulación o inhibición de los linfocitos T frente a enfermedad desmielinizante mediada por el sistema inmune usando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology*, mencionada anteriormente, unidades 15.1 y 15.2. Véanse también los modelos para enfermedad de mielina en los que los oligodendrocitos o células de Schwann se insertan en el sistema del uso central como se describe en Duncan, I. D. *et al*, *Molec. Med. Today* (1997) 554-561.

La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* sencillo de hipersensibilidad de tipo retardado de la función inmune mediada por células. En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos da lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado que se mide y se cuantifica. La sensibilidad por contacto implica una fase de sensibilización inicial seguido por una fase de estimulación. La fase de estimulación se produce cuando los linfocitos T se encuentran con un antígeno con el que ya habían tenido un contacto previo. Se produce hinchazón e inflamación, convirtiéndolo en un modelo excelente de dermatitis alérgica humana por contacto. Un procedimiento adecuado se describe con detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Véase también Grabbe, S. y Schwarz, T, *Immun. Today* 19 (1): 37-44 (1998).

Un modelo animal de artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable de artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondral. Los compuestos de la invención se pueden someter a ensayo para actividad frente a artritis autoinmune usando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente, unidades 15.5. Véase también el modelo que usa un anticuerpo monoclonal para integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A.C. *et al*, *Immunology* (1996) 88: 569.

Se ha descrito un modelo de asma en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, eosinofilia pulmonar e inflamación están inducidas por sensibilización de un animal con ovoalbúmina y a continuación estimulando al animal con la misma proteína administrada mediante aerosol. Varios modelos animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópica en seres humanos después de estimulación con antígenos en aerosol. Los modelos de murino tienen muchas de las características del asma humana. Algunos procedimientos adecuados para someter a ensayo los compuestos de la invención para actividad y eficacia en el tratamiento del asma se describen en Wolyniec, W. W. *et al*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18: 777 y las referencias mencionadas en el mismo.

Además, los compuestos de la invención se pueden someter a ensayar modelos animales de enfermedades similares a la psoriasis. Las evidencias sugieren una patogénesis de linfocitos T para psoriasis. Los compuestos de la invención se pueden someter al ensayo en el modelo de ratón scid/scid descrito en Schon, M. P. *et al*, *Nat. Med.* (1997) 3: 183, en el que los ratones demuestran lesiones cutáneas histopatológicas que se parecen a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera piel humana/ratón scid preparada como se describe en Nickoloff, B. J. *et al*, *Am. J. Path.* (1995) 146: 580.

Algunos modelos de animal recombinante (transgénico) se pueden modificar por ingeniería mediante la introducción de la parte de codificación de los genes identificados en el presente documento en el genoma de animales de interés, usando técnicas convencionales para producir animales transgénicos. Algunos animales que pueden servir como una diana para manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras,

cerdos, y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y humanos. Algunas técnicas conocidas en la técnica para introducir un transgén en tales animales incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, Patente de Estados Unidos n.º 4.873.191); transferencia genética mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); direccionamiento genético en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, Mol. Cel. Biol. 3, 1803-1814 [1983]); transferencia genética mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 4.736.866.

Para el fin de la presente invención, algunos animales transgénicos intuyen los que portan el transgén solamente en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén se puede integrar ya sea como un solo transgén, o en concatámeros, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o de cabeza a cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula en particular también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992).

La expresión del transgén en animales transgénicos se puede controlar con técnicas convencionales. Por ejemplo, para verificar la integración del transgén se puede usar análisis de transferencia de Southern o amplificación con PCR. El nivel de expresión del ARNm se puede analizar a continuación usando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de transferencia de Northern, PCR, o inmunocitoquímica.

Los animales se pueden examinar adicionalmente para signos de patología de enfermedad inmune, por ejemplo mediante examen histológico para determinar infiltración de células inmunes en tejidos específicos. También se pueden realizar experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos se tratan con los compuestos de la invención para determinar el alcance de la estimulación o inhibición de la proliferación de linfocitos T de los compuestos. En estos experimentos, los anticuerpos de bloqueo que se unen al polipéptido PRO87299, preparados como se ha descrito anteriormente, se administran al animal y se determina el efecto sobre la función inmune.

De forma alternativa, se pueden preparar animales con "supresión genética" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en el presente documento, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido en particular se puede usar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido en particular se puede suprimir o reemplazar con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede usar para controlar la integración. Por lo general, en el vector están incluidas varias kilobases de ADN de flanqueo sin alterar (tanto en los extremos en las posiciones 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha combinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase por ejemplo, Li *et al.*, Cell, 69: 915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A continuación, un embrión quimérico se puede implantar en un animal de acogida adecuado, hembra pseudopreñada y llevar a término el embrión para crear un animal con "supresión genética". La progenie que alberga el ADN de combinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar con técnicas convencionales y usar en animales de cría en los que todas las células del animal contienen el ADN del combinado de forma homóloga. Los animales con supresión genética se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debidas a ausencia del polipéptido.

#### I. Terapia InmunoAdyuvante

Los compuestos inmunoestimulantes descritos en el presente documento se pueden usar en terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores (cáncer). en la actualidad está bien establecido que algunos linfocitos T reconocen antígenos específicos de tumores humanos. Un grupo de antígenos tumorales, codificados con las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE, son silenciosos en todos los tejidos normales adultos, pero se expresan en cantidades significativas en tumores, tales como melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, y carcinomas de vejiga. DeSmet, C. *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 7149. Se ha mostrado que la coestimulación de linfocitos T induce la regresión tumoral y una respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. *et al.*, Nature Medicine (1997) 3: 682; Kwon, E. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 8099; Lynch, D. H. *et al.*, Nature Medicine (1997) 3: 625; Finn, O. J. y Lotze, M. T., J. Immunol. (1998) 21: 114. Los compuestos estimulatorios se pueden administrar como adyuvantes, solos o junto con un agente de regulación del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación de linfocitos T y una respuesta antitumoral antígenos tumorales. El agente de regulación del crecimiento, citotóxicos, o quimioterapéutico se puede administrar en cantidades convencionales usando regímenes de administración conocidos. La actividad inmunoestimulante con los compuestos permite cantidades reducidas de los agentes de regulación del crecimiento, citotóxicos o quimioterapéuticos disminuyendo de ese modo, de forma potencial, la toxicidad al paciente.

#### J. Ensayos de Identificación Sistemática para Candidatos a Fármaco

- Algunos ensayos de identificación sistemática para candidatos a fármaco se diseñan para identificar compuestos que se unen a, o que forman complejos, con los polipéptidos codificados por los genes identificados en el presente documento o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Tales ensayos de identificación sistemática incluirán ensayos susceptibles de identificación sistemática de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de candidatos a fármaco de molécula pequeña. Algunas moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, que incluyen péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina, y, en particular, anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos poli- y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos. Los ensayos se pueden realizar en diversos formatos, que incluyen ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de identificación sistemática bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que también están caracterizados en la técnica. Todos los ensayos tienen en común que exigen la puesta en contacto del candidato a fármaco con un polipéptido codificado por un ácido nucleico identificado en el presente documento en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.
- En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización en particular, el polipéptido codificado por el gen identificado en el presente documento o el candidato a fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente por lo general se consigue revistiendo la superficie sólida con una solución del polipéptido y secando. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a inmovilizar se puede usar para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede etiquetar con una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie revestida que contiene el componente anclado. Cuando la reacción es completa, los componentes que no han reaccionado se retiran, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que se ha producido la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva una etiqueta, la formación del complejo se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo etiquetado que se une de forma específica al complejo inmovilizado.
- Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a una proteína en particular codificada por un gen identificado en el presente documento, su interacción con esa proteína se puede someter a ensayo con métodos bien conocidos para detectar interacciones de proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, reticulación, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas de cromatografía. Además, las interacciones de proteína-proteína se pueden controlar usando un sistema genético basado en levadura descrito en Fields y colaboradores [Fields y Song, *Nature* (London) 340, 245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] como se desvela en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares y secamente separados, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones mencionadas anteriormente (denominado generalmente "sistema de dos híbridos") toma ventaja de esta propiedad, y usa dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada con el dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas de activación candidatas están fusionadas con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador de GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de interacción de proteína-proteína. Algunas colonias que contienen polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones de proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible en el mercado en Clontech. Este sistema también se puede extender para formar mapas de dominios de proteínas implicados en interacciones de proteínas específicas así como para localizar restos de aminoácidos que son fundamentales para estas interacciones.
- Para encontrar compuestos que interfieren con la interacción de un gen identificado en el presente documento y otros componentes intra- o extracelulares que se pueden someter a ensayo, normalmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un periodo de tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para someter a ensayo la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. La unión (formación de complejos) entre el compuesto de ensayo y el componente intra- o extracelular presentes en la mezcla se controla como se ha descrito anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su compañero de reacción.

## K. Composiciones y Métodos para el Tratamiento de Enfermedades Relacionadas con el Sistema Inmune

Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen, pero no se limitan a, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y  
 5 ribozimas, moléculas de triple hélice, etc. que inhiben o estimulan la función inmune, por ejemplo, proliferación/activación de linfocitos T, liberación de linfoquinas, o infiltración de células inmunes.

Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido y de ARN actúan bloqueando directamente la traducción del ARNm y dándose con el ARNm objetivo y evitando la traducción de la proteína. Cuando se usa ADN antisentido, son  
 10 preferentes los oligodexoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótidos de genes diana.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión  
 15 endonucleolítica. Algunos sitios específicos de escisión de ribozimas dentro de una diana de ARN potencial se pueden identificar con técnicas conocidas. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology 4, 469-471 (1994), y la publicación de PCT n.º WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberían ser de una sola cadena y están formadas por desoxinucleótidos. La composición de la base de los oligonucleótidos se diseña  
 20 de modo que estimule la formación de la triple hélice a través de reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que por lo general requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, la publicación de PCT n.º WO 97/33551, mencionada anteriormente.

Estas moléculas se pueden identificar con cualquiera o cualquier combinación de los ensayos de identificación sistemática discutidos anteriormente y/o con cualquier otra técnica de identificación sistemática bien conocido por los  
 25 expertos en la materia.

## L. Anticuerpos Anti-PRO87299

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos anti-PRO87299. Algunos anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados.

### 1. Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos anti-PRO87299 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los expertos en la materia conocen algunos métodos para preparar anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante.  
 35 Por lo general, el agente de inmunización y/o adyuvantes se puede inyectar en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente de inmunización puede incluir el polipéptido PRO87299 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil para conjugar el agente de inmunización con una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Algunos ejemplos de tales proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidores de tripsina de soja. Algunos ejemplos de adyuvantes que se pueden usar incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante de MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización lo  
 45 puede seleccionar un experto en la materia sin experimentación excesiva.

### 2. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos anti-PRO87299 pueden ser, como alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridoma, tales como los que se describen en Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, por lo general, un ratón, hámster, u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza con un agente de inmunización para obtener linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica al agente de inmunización. Como alternativa, los  
 50 linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Por lo general, el agente de inmunización incluirá el polipéptido PRO87299 o una proteína de fusión del mismo. Por lo general, los linfocitos de sangre periférica ("PBL") se usan si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan a  
 60 continuación con una línea de células inmortalizadas usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas de células inmortalizadas son normalmente células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen de roedor, bovino y ser humano. Normalmente, se usan líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas, sin funcionar. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa  
 65

(HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

5 Las líneas de células inmortalizadas preferentes son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo mediante las células que producen anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Algunas líneas de células inmortalizadas más preferentes son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. Algunas líneas de células de mieloma humano y de heteromioma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

15 El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma a continuación se puede someter a ensayo para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a PRO87299. 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 de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA). En la técnica se conocen tales técnicas y ensayos. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, con el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

20 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y mediante cultivo con métodos convencionales [Goding, mencionado anteriormente]. Algunos medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado con Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

25 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo obstruido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad.

30 Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar con métodos de ADN recombinante, tales como los que se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferente de un ADN de este tipo. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfieren 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 inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias de murino homólogas [Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, mencionado anteriormente] o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Un polipéptido que no es inmunoglobulina de este tipo se puede sustituir para los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir para los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

50 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. En la técnica se conocen bien algunos métodos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo como un método implica de expresión recombinantes de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada está truncada por lo general en cualquier punto en la región Fc con el fin de prevenir la reticulación de la cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes están sustituidos con otro resto de aminoácido o están suprimidos con el fin de prevenir la reticulación.

55 Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos de Fab, se puede conseguir usando técnicas de rutina conocidas en la técnica.

### 3. Anticuerpos Humanos y Humanizados

60 Los anticuerpos anti-PRO87299 de la invención pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que algunos restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que

5 tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de marco conservado de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. De forma óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina

10 (Fc), por lo general el de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:5 93-596 (1992)].

15 En la técnica se conocen bien algunos métodos para la humanización de anticuerpos no humanos a. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de "importación", que por lo general se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar básicamente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), en los que básicamente en menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

25 Algunos anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]. Del mismo modo, algunos anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o totalmente. Después de la estimulación, se observa producción de anticuerpo humano, que en gran medida se parece a la observada en seres humanos en todos los aspectos. Incluyendo reordenamiento genético, ensamblaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.ºs 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

40 Los anticuerpos también se pueden madurar por afinidad usando métodos conocidos de selección y/o mutagénesis como se ha descrito anteriormente. Algunos anticuerpos madurados por afinidad preferentes tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 o 30 veces superior a la del anticuerpo de partida (por lo general murino, humanizado o humano) a partir del que se prepara el anticuerpo madurado.

#### 4. Anticuerpos Biespecíficos

50 Algunos anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de uniones para el PRO87299, la otra es para cualquier antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor o subunidad de receptor de superficie celular.

55 En la técnica se conocen algunos métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solamente una tienen la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se consigue mediante etapas de cromatografía por afinidad. Algunos procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

65 Algunos dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Es preferente que la primera región constante de cadena pesada (CH1)

contenga el sitio necesario para unión de la cadena ligera presente 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 cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo se pueden modificar por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar al de la cadena o cadenas laterales grandes en la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otros más pequeños (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de un heterodímero con respecto a otros productos terminales no deseados tales como homodímeros.

Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>). En la bibliografía se han descrito algunas técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, algunos anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que algunos anticuerpos intactos se escinden de forma proteolítica para generar fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditiolos vecinales y prevenir formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos de Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos de Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar por vía química para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')<sub>2</sub> totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' se secretó de forma separada a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigidos *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como capaz de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, algunos anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun estaban unidos a las partes Fab' de todos anticuerpos diferentes mediante fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron a la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) a proporcionar un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) mediante un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

En el presente documento, algunos anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes en un polipéptido PRO87299 dado. Como alternativa, una rama de polipéptido anti-PRO87299 se puede combinar con una rama que se une a una molécula de mecanismo desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrarse en mecanismos de defensa celular para la célula que expresa el polipéptido PRO87299 en particular. Algunos anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos para células que expresan un polipéptido PRO87299 en particular. Estos anticuerpos poseen una rama de unión a PRO87299 y una rama que se une a un agente citotóxico o a un agente quelante radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO87299 y además se une al factor tisular (TF).

### 5. Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están formados por dos anticuerpos unidos de forma covalente. Por ejemplo, se ha propuesto que tales anticuerpos se dirigen células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980], y para tratamiento de infección por VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína sintética, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, algunas inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter.

Algunos ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 4.676.980.

### 6. Modificación por Ingeniería de la Función Efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, un resto o restos de cisteína se puede introducir en la región Fc, permitiendo de este modo formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede presentar un aumento de la capacidad de internalización y/o aumento de la muerte celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar algunos anticuerpos homodiméricos con aumento de la actividad antitumoral usando agentes de reticulación heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, un anticuerpo se puede modificar por ingeniería para que tenga regiones de Fc y de ese modo pueden presentar aumento de la lisis del complemento y capacidades de ADCC. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

### 7. Inmunconjugados

En el presente documento se describen algunos inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Algunos agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de tales inmunconjugados se han descrito anteriormente. Algunas toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Diversos radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , y  $^{186}\text{Re}$ .

Los conjugados del anticuerpo y agentes citotóxicos se preparan usando diversos agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como de propionato N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiampentaacético etiquetado con Carbono 14 (MX-DTPA) es un agente de quelación a modo de ejemplo para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

El anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para uso en una dirección previa hacia tumor en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada del conjugado sin unir de la circulación usando una gente de eliminación y a continuación administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

### 8. Inmunoliposomas

Los anticuerpos desvelados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan con métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 4.485.045 y 4.544.545. En la Patente de Estados Unidos n.º 5.013.556 se desvelan de liposomas con aumento del tiempo de circulación.

Algunos liposomas particularmente útiles se pueden generar con el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está contenido opcionalmente dentro de los liposomas. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81 (19); 1484 (1989).

#### M. Composiciones Farmacéuticas

Las moléculas de PRO87299 activo descritas en el presente documento (por ejemplo, los polipéptidos PRO87299, anticuerpos anti-PRO87299, y/o variantes de cada uno) así como otras moléculas identificadas con los ensayos de identificación sistemática desvelados anteriormente, se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, en forma de composiciones farmacéuticas.

Algunas formulaciones terapéuticas de la molécula activa de PRO87299, preferentemente un polipéptido o anticuerpo, se preparan para almacenamiento mediante mezcla de la molécula activa que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980] ), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Algunos vehículos con excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes de quelación tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Algunos compuestos identificados con los ensayos de identificación sistemática desvelados en el presente documento se pueden formular de una manera análoga, usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

Para administrar la molécula de PRO87299 en células, también se pueden usar de lipofecciones o liposomas. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, es preferente el fragmento inhibidor más pequeño que se une de forma específica al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retengan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Tales péptidos se pueden sintetizar de forma química y/o se puede producir mediante tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]).

En el presente documento, la formulación también puede contener más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación que se está tratando en particular, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se influyen entre sí de forma adversa. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Las moléculas de PRO87299 activo también pueden estar atrapadas en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidal es de administración del fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida o las moléculas de PRO87299. Algunos ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos modelados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables formadas por copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico. Aunque algunos polímeros

tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten liberar moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un periodo de tiempo largo, éstos se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear algunas estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

#### N. Métodos de Tratamiento

Se contempla que los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos activos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar diversas enfermedades y afecciones relacionadas con el sistema inmune, tales como enfermedades mediadas por linfocitos T, incluyendo las caracterizadas por infiltración de células inflamatorias en un tejido, estimulación de proliferación de linfocitos T, inhibición de la proliferación de linfocitos T, aumento o disminución de la permeabilidad vascular o la inhibición de los mismos.

Algunas afecciones o trastornos a tratar con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la invención, incluyen, pero no se limita, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, osteoartritis, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad intestinal inflamatoria (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas mediadas por el sistema autoinmune o inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante, incluyendo rechazo a injerto y enfermedad de injerto contra hospedador.

En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos auto-reactivos a proteínas/tejidos propios y la posterior generación de inflamación mediada por el sistema inmune. Los anticuerpos ya sea directa o indirectamente median la lesión tisular. Aunque no se ha mostrado que los linfocitos T estén implicados directamente en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos auto-reactivos. La génesis de la enfermedad es, por lo tanto, dependiente de los linfocitos T. Múltiples órganos y sistemas se ven afectados clínicamente, incluyendo riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, sistema mucocutáneo, ocular, nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que implica principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones dando como resultado lesión del cartílago articular. La patogénesis depende de los linfocitos T y está asociada a la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra la propia IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan niveles elevados en sangre y líquido de la articulación. Estos complejos en la articulación pueden inducir el infiltrado notable de linfocitos y monocitos en la membrana sinovial y cambia sinoviales marcados posteriores; el espacio/líquido articular está infiltrado con células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, a menudo en un patrón simétrico. Sin embargo, la enfermedad extra-articular también se produce en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con enfermedad de articulaciones progresiva en curso y lesiones habituales de fibrosis pulmonar, vasculitis, y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extra-articular es el llamado síndrome de Felty que se produce tarde en el curso de la enfermedad RA, en ocasiones después de que la enfermedad de las articulaciones se haya convertido en quiescente, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede ir acompañado por vasculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras en la piel y gangrena. Los pacientes a menudo también desarrollan nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo subyacente a las articulaciones afectadas; los nódulos de etapa tardía tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado celular inflamatorio mixto. Otras manifestaciones que pueden se pueden producir en la RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca, y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que a menudo empieza con una edad inferior a 16 años. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que son positivos para el factor

reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y por lo general es destructiva y conduce a anquilosis de las articulaciones y retraso del crecimiento. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

5 Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto genético de HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada a enfermedad intestinal inflamatoria, espondilitis asociada a psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía indiferenciada. Algunas características distintivas incluyen  
10 sacroileítis con o sin espondilitis; artritis asimétrica inflamatoria; asociación con HLA-B27 (un alelo serológicamente definido del locus HLA-B de MHC de clase I); inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados a otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8<sup>+</sup>, una célula que se dirige a antígenos presentados por moléculas del MHC de clase I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pueden reaccionar contra el alelo HLA-B27 de MHC de clase I, como si se tratara de un péptido extraño expresado por  
15 moléculas de MHC de clase I. Se ha planteado la hipótesis de que un epítipo de HLA-B27 puede imitar a un epítipo antigénico bacteriano u otro epítipo antigénico microbiano y por lo tanto inducir una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

La esclerosis sistémica (esclerodermia) tiene una etiología desconocida. Una característica distintiva de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente ésta está inducida por un proceso inflamatorio activo. La esclerodermia  
20 puede ser localizada o sistémica; las lesiones vasculares son comunes y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura es un suceso temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por el sistema inmune. Una base inmunológica está implicada por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos anti-nucleares en muchos pacientes. A menudo la ICAM-1 es regulara de forma positiva en la superficie celular de los fibroblastos en lesiones cutáneas lo que  
25 sugiere que la interacción de los linfocitos T con estas células pueda tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Otros órganos implicados incluyen: el tracto gastrointestinal: atrofia del músculo liso y fibrosis que da como resultado peristaltismo/motilidad anómalos; riñón: proliferación íntima subendotelial concéntrica que afecta a las pequeñas arterias arqueadas e interlobulares con el resultado de disminución del flujo sanguíneo cortical renal, da como resultado proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación;  
30 pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas inflamatorias que incluyen dermatomiositis, polimiositis y otras son trastornos de inflamación muscular crónica de etiología desconocida que dan como resultado debilidad muscular. A menudo, la lesión/inflamación muscular es simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos están asociados a la mayoría de formas.  
35 Estos autoanticuerpos específicos de miositis se dirigen contra e inhiben la función de componentes, proteínas y ARN, implicados en la síntesis de proteínas.

El síndrome de Sjögren se debe a una inflamación mediada por el sistema inmune y posterior destrucción funcional de las glándulas lagrimales y las glándulas salivales. La enfermedad puede estar asociada a o acompañada por  
40 enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad está asociada a la producción de autoanticuerpos contra antígenos Ro y La, ambos de los cuales son pequeños complejos de ARN-proteína. Las lesiones dan como resultado queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial, y púrpura palpable.

45 Las vasculitis sistémicas son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y posterior daño a los vasos sanguíneos que da como resultado isquemia/necrosis/degeneración de los tejidos suministrados por los vasos afectados y disfunción ocasional de órganos diana en algunos casos. Las vasculitis también se pueden producir como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades mediadas por el sistema inmune-inflamatorio tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., en particular en enfermedades también asociadas a la formación de  
50 complejos inmunes. Algunas enfermedades del grupo de la vasculitis sistémica primaria incluyen: vasculitis necrotizante sistémica: poliarteritis nodosa, angeítis y granulomatosis alérgica, poliangeítis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis linfomatoide; y arteritis de células gigantes. Algunas vasculitis diversas incluyen: síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del SNC aislada, enfermedad de Behet, tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. Se cree que el mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis enumerados es debido principalmente a la deposición  
55 de complejos de inmunoglobulina en la pared de los vasos y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria ya sea a través de ADCC, activación del complemento, o ambos.

La sarcoidosis es una afección de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido en el cuerpo; la implicación del pulmón es la más común. La patogénesis implica  
60 la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con las posteriores secuelas crónicas resultantes de la liberación de productos activos liberados de forma local o sistémica por estos tipos de células.

65 La anemia hemolítica autoinmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune, pancitopenia inmune, y hemoglobinuria paroxística nocturna es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en

la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas incluyendo plaquetas también) y es un reflejo de la eliminación de aquellas células revestidas con anticuerpo a través de lisis mediada por anticuerpos y/o mecanismos mediados por ADCC/receptor de Fc.

5 En la trombocitopenia autoinmune incluyendo púrpura trombocitopénica, y trombocitopenia mediada por el sistema inmune en otros entornos clínicos, la destrucción/eliminación de las plaquetas se produce como resultado ya sea de cualquier anticuerpo o complemento que se une a las plaquetas y posterior eliminación por lisis de complemento, mecanismos mediados por ADCC o el receptor de Fc.

10 La tiroiditis incluyendo enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, y tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmune contra antígenos tiroideos con producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes en y a menudo específicas para la glándula tiroidea. Existen modelos experimentales que incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollo obeso); modelos inducibles: inmunización de animales con tiroglobulina, antígeno microsomal tiroideo (peroxidasa tiroidea).

15 La diabetes mellitus de tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos; esta destrucción está mediada por auto-anticuerpos y linfocitos T autorreactivos. Los anticuerpos contra la insulina o el receptor de insulina también pueden producir el fenotipo de insulina de falta de respuesta.

20 Las enfermedades renales mediadas por el sistema inmune, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de lesión del tejido renal mediada por anticuerpos o linfocitos T ya sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o linfocitos T contra antígenos renales o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunes en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. Por lo tanto, otras enfermedades mediadas por el sistema inmune que dan como resultado la formación de complejos inmunes también pueden inducir enfermedad renal mediada por el sistema inmune como una secuela indirecta. Los mecanismos inmunes tanto directos como indirectos dan como resultado una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales con el resultado de alteración de la función del órgano y en algunos casos la evolución a insuficiencia renal. Los mecanismos inmunes tanto humorales como celulares pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

35 Se cree que algunas enfermedades desmielinizantes de los sistemas nervioso central y periférico, incluyendo esclerosis múltiple; polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, tienen una base autoinmune y dan como resultado la desmielinización del nervio como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o a la mielina directamente. En la EM hay evidencias que sugieren que la inducción y la progresión de la enfermedad dependen de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que depende de los linfocitos T y tiene ya sea un transcurso de recaída-remisión o un transcurso progresivo crónico. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, predisposición genética, medio ambiente, y autoinmunidad todas contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados mediados de forma preeminente por linfocitos T, células microgliales y macrófagos infiltrantes; los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son el tipo celular predominante en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular de oligodendrocitos y la desmielinización posterior no se conoce, pero es probable que esté dirigido por los linfocitos T.

45 La enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, incluyendo neumonías eosinofílicas; fibrosis pulmonar idiopática, y neumonitis por hipersensibilidad puede implicar una respuesta inmune inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta sería de beneficio terapéutico.

50 La enfermedad de la piel autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme, y dermatitis por contacto están mediadas por auto-anticuerpos, cuya génesis depende de los linfocitos T.

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

55 Algunas enfermedades alérgicas, incluyendo asma; rinitis alérgica; dermatitis atópica; hipersensibilidad alimentaria; y urticaria son dependientes de linfocitos T. Estas enfermedades están mediadas predominantemente por la inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

60 Algunas enfermedades asociadas a trasplante, incluyendo rechazo al injerto y Enfermedad de Injerto Contra Hospedador (GVHD) son dependientes de linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es paliativa.

Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmune y/o inflamatoria tiene beneficio son las enfermedades infecciosas que incluyen, pero no se limitan, infección viral (que incluye, pero no se limita a SIDA, hepatitis A, B, C, D, E y herpes), infección bacteriana, infecciones fúngicas e infecciones por protozoos y parásitos (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden usar de forma terapéutica para potenciar la respuesta inmune a agentes infecciosos), algunas enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan la MLR de forma terapéutica se pueden usar para potenciar la respuesta inmune para afecciones de

inmunodeficiencia heredada, adquirida, infecciosa inducida (como en infección por VIH), o iatrogénica (es decir, a partir de quimioterapia) y tumor maligno.

Se ha demostrado que algunos pacientes de cáncer humanos desarrollan una respuesta a anticuerpos y/o linfocitos T con respecto a antígenos en células neoplásicas. También se ha demostrado en modelos animales de tumor maligno que el aumento de la respuesta inmune puede dar como resultado rechazo o regresión de ese tumor maligno en particular. Las moléculas que aumentan la respuesta de los linfocitos T en la MLR tienen utilidad *in vivo* para aumentar la respuesta inmune contra tumor maligno. Las moléculas que mejoran la respuesta proliferativa de los linfocitos T en la MLR (o agonistas de molécula pequeña o anticuerpos que afectaban al mismo receptor en una manera agonista) se pueden usar de forma terapéutica para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de linfocitos en la MLR también funcionan *in vivo* para el tumor maligno para suprimir la respuesta inmune a un tumor maligno; tales moléculas se pueden expresar por las propias células neoplásicas o su expresión puede ser inducida por el tumor maligno en otras células. El antagonismo de dichas moléculas inhibitoras (ya sea con anticuerpos, antagonistas de moléculas pequeñas u otros medios) aumenta el rechazo del tumor mediado por el sistema inmune.

Además, la inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener beneficio terapéutico en la lesión por reperfusión; apoplejía; infarto de miocardio; aterosclerosis; lesión pulmonar aguda; shock hemorrágico; quemaduras; sepsis/shock séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad articular degenerativa y pancreatitis.

Los compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos, se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación (intranasal, intrapulmonar). La administración intravenosa o inhalada de polipéptidos y anticuerpos es preferente.

En la terapia con inmunoadyuvante, otros regímenes terapéuticos, tales como administración de un agente anti-cáncer, se pueden combinar con la administración de las proteínas, anticuerpos o compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con un inmunoadyuvante de la invención también puede recibir un agente anti-cáncer (agente quimioterapéutico) o terapia de radiación. Los programas de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine de forma empírica el médico experto. Los programas de preparación y de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración del inmunoadyuvante o se puede administrar de forma simultánea con el mismo. Además, un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno o una anti-progesterona tal como onapristona (véase el documento EP 616812) se puede administrar en dosificaciones conocidas para tales moléculas.

Puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados a enfermedad inmune o asociados a tumor, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF). Como alternativa, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes desvelados en la presente se pueden coadministrar al paciente. En ocasiones, también puede ser beneficioso administrar una o más citoquinas al paciente. En una realización, los polipéptidos PRO87299 se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar primero, seguido de un polipéptido PRO87299. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración primero. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las usadas en la actualidad y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido PRO87299.

Para el tratamiento o reducción de la gravedad de la enfermedad relacionada con el sistema inmune, la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al compuesto, y el criterio del médico que prescribe. El compuesto se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido o anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria habitual podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

#### O. Artículos de Fabricación

En el presente documento también se describe un artículo de fabricación que contiene materiales (por ejemplo, que comprende una molécula de PRO87299) útil para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos que se han descrito

anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una instrucción. Algunos recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de la diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico buen tratamiento de la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es normalmente un polipéptido o un anticuerpo de la invención. Una instrucción o etiqueta en el, o asociada al, recipiente indica que la composición se usa para diagnóstico o tratamiento de la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluirse adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

#### P. Diagnóstico y Pronóstico de Enfermedad Relacionada con el Sistema Inmune

Las proteínas de superficie celular, tales como proteínas que se sobreexpresan en ciertas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, son dianas excelentes para candidatos a fármaco o tratamiento de enfermedades. Las mismas proteínas junto con las proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en patologías relacionadas con el sistema inmune encuentra en su adicional en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, en diagnóstico o pronóstico se pueden usar anticuerpos dirigidos contra los productos proteicos de genes amplificados en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, u otras enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, para detectar de forma cualitativa o cuantitativa la expresión de proteínas codificadas por genes amplificados o sobreexpresados ("productos genéticos marcadores"). El anticuerpo está equipado con una etiqueta detectable, por ejemplo, por ejemplo una etiqueta fluorescente, y la unión se puede controlar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen sobreexpresado codifica una proteína de la superficie celular. Tales ensayos de unión se realizan esencialmente como se ha descrito anteriormente.

La detección de la unión de anticuerpo *in situ* a los productos genéticos marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia con microscopía inmunoelectrónica. Para este fin, una muestra de ensayo histológica se retira del paciente, y un anticuerpo etiquetado se aplica sobre la misma, preferentemente mediante superposición del anticuerpo en una muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto genético marcador en el tejido examinado. Para los expertos en la materia será evidente que una amplia diversidad de métodos histológicos están rápidamente disponibles para detección *in situ*.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

#### **Ejemplos**

Algunos reactivos disponibles en el mercado mencionados en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique de otro modo. La fuente de esas células se identifica en los siguientes ejemplos, y a través de la memoria descriptiva, con los números de registro en la ATCC en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

#### EJEMPLO 1: Clonación de PRO87299

Se buscó una base de datos de ADN (Merck/Washington University) de etiqueta de secuencia expresada (EST) y se identificó una EST que contenía dominios de interés, de forma específica dominio(s) de Inmunoglobulina y Motivo(s) de Inhibición de Inmuno Tirosina (ITIM). La búsqueda se realizó usando el programa informático BLAST o BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)] usando como comparación los dominios de interés de una traducción de marco 6 de las secuencias. Esas comparaciones que dan como resultado una puntuación de BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o superior que no codifican proteínas conocidas se agruparon si fuera necesario, se ensamblaron en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Basándose en la secuencia como se ha descrito anteriormente, se sintetizan algunos oligonucleótidos: 1) para identificar, mediante PCR, una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para uso como sondas para aislar un clon de la secuencia de codificación de longitud completa para PRO87299. Los cebadores de PCR directos e inversos por lo general varían de 20 a 30 nucleótidos y a menudo se diseñan para dar un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de sonda por lo general tienen una longitud 40-55 pb. En algunos casos, las oligonucleótidos adicionales se sintetizan cuando la secuencia consenso tiene un tamaño superior a aproximadamente 1-1,5 kpb. Para identificar sistemáticamente varias bibliotecas de un clon de longitud

completa, el ADN de las bibliotecas se identificó sistemáticamente mediante amplificación de PCR, de acuerdo con Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, mencionado anteriormente, con el par cebador de PCR. A continuación se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codifican el gen de interés usando el oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebador.

5

Las sondas de oligonucleótidos usadas fueron las que siguen a continuación:

Cebador directo: hBTig.EcoRI.F2 5' TTGAATTCATGAAGACATTGCCTGCCATGC 3' (SEQ ID NO: 3) Cebador  
inverso: hBTig.BamHI.R2 5' TTGGATCCTTAACCTCACACATATGGATGCATATTC 3' (SEQ ID NO: 4)

10

En la clonación se usó una biblioteca de ADNc de sangre humana. La biblioteca de ADNc usada para aislar los clones de ADNc se construyó con métodos convencionales usando reactivos disponibles en el mercado tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio NotI, unido con adaptadores Romos para Sall hemiquinasados, se escindió con NotI, de tamaño apropiado para electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; véase, Holmes *et al.*, Science, 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios XhoI y NotI únicos.

15

Toda la secuencia de nucleótidos del clon, denominada DNA332467 en el presente documento, se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El clon DNA332467 contiene un solo marco de lectura abierto individual con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones 24-26 y una señal de parada en las posiciones 891-893 del nucleótido (Figura 1, SEQ ID NO: 1). El precursor del polipéptido predicho tiene una longitud de 289 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 32781 daltons y un pI de aproximadamente 6,27. El análisis de la secuencia de PRO87299 de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) pone en evidencia la presencia de diversos dominios de polipéptidos importantes como se muestra en la Figura 2, en la que las posiciones dadas para esos dominios de polipéptidos son aproximadamente como se ha descrito.

20

25

Un análisis de la base de datos de proteínas actual, usando el análisis de alineamiento de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), ponía en evidencia la identidad de las secuencias entre la secuencia de aminoácidos de PRO87299 y ninguna secuencia de proteínas conocida.

30

#### EJEMPLO 2: Análisis de micromatrices de linfocitos T estimulados

Las micromatrices de ácido nucleico, que a menudo contienen miles de secuencias genéticas, son útiles para identificar genes expresados de forma diferencial en tejidos dañados en comparación con sus homólogos normales. Usando micromatrices de ácido nucleico, muestras de ARNm de ensayo y control se transcriben de forma inversa y se etiquetan para generar sondas de ADNc. Las sondas de ADNc se hibridan a continuación a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizada en un soporte sólido. La matriz se configura de modo que la secuencia y posición de cada miembro de la matriz se conoce. Por ejemplo, una selección de genes conocidos por expresarse en ciertas patologías se puede a en un soporte sólido. La hibridación de una sonda etiquetada con un miembro de la matriz en particular indica que la muestra a partir de la que se derivó la sonda expresa ese gen. Si la señal hibridación de una sonda de una muestra de ensayo (en este caso, linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados) es mayor que la señal hibridación de una sonda de una muestra de control (en este caso, linfocitos T CD4<sup>+</sup> no estimulados), el gen o genes sobreexpresados en el tejido de ensayo se identifican. La amplificación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido de ensayo es útil no solamente como un marcador de diagnóstico para la presencia de la patología, sino también como una diana terapéutica para el tratamiento de la patología.

35

40

45

La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología micromatrices se conoce bien en la técnica. En un ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para hibridación y sondas, portaobjetos, y condiciones de hibridación todos se detallan en la Solicitud de Patente de PCT con n.º de Serie PCT/US01/10482, presentada el 30 de marzo de 2001 y que se incorpora en el presente documento por referencia.

50

En este experimento, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se purificaron a partir de un solo donante usando el protocolo de RossetteSep™ de (Stem Cell Technologies, Vancouver BC) que contiene anticuerpos anti-CD8, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36 y anti-CD56 usados para producir una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados se activaron con un anticuerpo anti-CD3 (usado a una concentración que no estimula la proliferación). Con cualquiera de anticuerpo ICAM-1 o anti-CD28. A las 24 o 72 horas, las células se cosecharon, el ARN se extrajo y el análisis se realizó en micromatrices de Affimax™ (Affymetrix Inc. Santa Clara, CA). Las células no estimuladas (en reposo) se cosecharon inmediatamente después de la purificación, y se sometieron al mismo análisis. Se compararon los genes cuya expresión estaba regulada de forma positiva en cualquiera de los dos puntos temporales en células activadas con respecto a las que están en reposo.

55

60

El resultado de estos experimentos es que los polipéptidos PRO87299 de la presente invención están sobreexpresados de forma significativa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados activados con anti-CD3/ICAM-1 y anti-CD3/anti-CD28 en comparación con linfocitos T CD4<sup>+</sup> en reposo aislados. Como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que los polipéptidos PRO87299 de la presente invención son útiles no solamente como marcadores de diagnóstico para la presencia de uno o más trastornos inmunes, sino que también sirven como dianas terapéuticas

65

para el tratamiento de esos trastornos inmunes.

#### EJEMPLO 5: PRO87299 en Linfoma

5 El linfoma es el 6<sup>a</sup> tumor maligno más habitual en Estados Unidos. En Estados Unidos se realizó un cálculo de 43.000 nuevos casos de linfoma en 1990. El linfoma No Hodgkin representa la mayoría de los casos, con los casos de linfoma de Hodgkin en un alejado segundo lugar. La incidencia de linfoma No Hodgkin aumenta de forma progresiva con la edad. Pero en la enfermedad de Hodgkin, hay una incidencia elevada en pacientes con edades de 20-30 años, una meseta entre 30-55 años y otro aumento después de los 55 años. Los individuos masculinos tienen un riesgo más elevado tanto de enfermedad de Hodgkin como de linfoma no Hodgkin que las hembras. La manifestación clínica principal del linfoma maligno es la hinchazón del ganglio linfático y síntomas que incluyen fiebre, malestar y pérdida de peso. Algunos sitios primarios comunes del linfoma incluyen ganglios linfáticos supraclaviculares, axilares, mediastinales, periaórticos, cervicales, e inguinales. El linfoma también presenta el potencial de hacer metástasis en otros órganos.

15 La enfermedad Hodgkin fue descrita en primer lugar por Thomas Hodgkin en 1832. La enfermedad de Hodgkin es una proliferación sin límites de una célula linfoide que llega a aumentar de tamaño, con un citoplasma pálido abundante y dos o más núcleos lobulados ovalados que contienen nucleolos grandes. Las células con este aspecto se conocen como células de Reed-Sternberg. Las células de Reed-Sternberg son importantes para el diagnóstico de la enfermedad de Hodgkin, pero su presencia sola no es suficiente para diagnóstico. La enfermedad de Hodgkin es distinta al linfoma no Hodgkin en tipo celular, histología del ganglio linfático, y en la sintomatología, tal como fiebre. La enfermedad de Hodgkin por lo general presenta una ampliación de un solo grupo de ganglios linfáticos periféricos, y puede implicar a los ganglios contiguos, pero no es frecuentemente extranodal. La causa de la enfermedad de Hodgkin es desconocida, pero la infección anterior por el Virus de Epstein Barr y translocaciones de bcl-2 están asociadas al desarrollo de la enfermedad de Hodgkin.

20 Los linfomas no Hodgkin son tumores malignos del sistema inmune que surgen en los ganglios linfáticos, pero se diferencian de la enfermedad de Hodgkin en factores tales como el tipo de célula y la sintomatología presentada por el paciente. La mayoría de los linfomas no Hodgkin son de fenotipo de linfocitos B y son positivos para los marcadores CD19 y CD20. Un número más pequeño son los linfomas de linfocitos T y son positivos para los marcadores CD2 y CD3.

30 Una base de datos patentada que contiene información de expresión genética (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) se analizó en un intento de identificar si el polipéptido PRO87299 (y sus ácidos nucleicos de codificación) está regulado de forma positiva significativamente en linfoma en comparación con tejidos linfáticos normales. De forma específica, se realizó un análisis de la base de datos GeneExpress® usando cualquier software disponible a través de Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para su uso con la base de datos GeneExpress® o con software patentado escrito y desarrollado en Genentech, Inc. para su uso con la base de datos GeneExpress®. La calificación de los éxitos positivos en el análisis se basa en varios criterios que incluyen, por ejemplo; especificidad tisular, especificidad y nivel de expresión tumoral en tejidos normal esencial y/o normal en proliferación. El resultado es que PRO87299 pone en evidencia una expresión elevada en el linfoma en comparación con otros tumores y/o tejidos normales y opcionalmente una expresión relativamente baja en tejidos normal esencial y/o normal en proliferación.

#### EJEMPLO 4: PRO87299 en Enfermedad Intestinal Inflamatoria

50 En este experimento, un ensayo de micromatriz se usó para encontrar genes que se sobreexpresan en IBD en comparación con el tejido normal del intestino. Se obtuvieron biopsias de pacientes con IBD. Para cada paciente con IBD, se tomaron muestras de tejido enfermo (ya sea UC o de Crohn) y de intestino sano, de manera que los patrones de expresión se pudieran comparar mejor. Todas las muestras se almacenaron a -70 °C hasta que estuvieran listas para el aislamiento de ARN. Las biopsias se homogeneizaron en 600 ul de tampón RLT (+ BME) y el ARN se aisló usando columnas Qiagen™ Rneasy Mini (Qiagen) con tratamiento de DNasa en columna siguiendo las directrices del fabricante. Tras el aislamiento del ARN, el ARN se cuantificó usando RiboGreen™ (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante y se comprobó en geles de agarosa para integridad. Las cantidades apropiadas de ARN se etiquetaron para análisis de micromatrices y las muestras se desarrollaron en micromatriz patentada por Genentech y micromatrices Affymetrics™. Se compararon los genes cuya expresión estaba regulada de forma positiva en tejido de IBD con respecto a tejido intestinal normal, haciendo coincidir biopsias de tejido intestinal normal y de IBD del mismo paciente. Los resultados de este experimento mostraban que se ha identificado PRO87299 como sobreexpresado de forma significativa en muestras de Enfermedad de Crohn en comparación con el tejido intestinal normal.

#### EJEMPLO 5: Expresión de PRO87299 en linfocitos NK

65 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son una célula efectora importante del sistema inmune innato. Están especializados para realizar eliminación con respecto a células hospedadoras que ya se han infectado con virus, parásitos o que han llegado a ser cancerosas. De forma fenotípica, los linfocitos NK son linfocitos granulares grandes

que constituyen ~2 % de la población de linfocitos en circulación. Normalmente se identifican mediante la expresión en superficie celular de CD56 y CD16. Maduran en la médula ósea de una célula precursora CD34<sup>+</sup> que comparten con los linfocitos T. El linfocito NK maduro, comparten la expresión de la maquinaria citolítica de CD8, y algunos KIR, con linfocitos T, pero sigue siendo distinto de los linfocitos T porque carece de CD3 y de los receptores de linfocitos T.

5 Al igual que los linfocitos T citotóxicos, contienen gránulos cargados con proteína formadora de poros, citotoxinas, serina esterases y proteoglicanos que median la lisis de las células diana. Tanto los linfocitos T como los linfocitos NK citotóxicos matan en contacto uniéndose a sus dianas y administrando su estallido letal de agentes químicos que produce agujeros en la membrana de la célula diana. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, no es necesario que los linfocitos NK reconozcan un antígeno específico antes de comenzar la lisis. En su lugar, la activación de los linfocitos NK puede

10 estar mediada por factores de crecimiento y citoquinas (en particular, se ha mostrado que IL-2, IL-12 y IL-15 median las actividades proliferativas y citotóxicas o mediante un equilibrio delicado entre dos clases de receptores de linfocitos NK, uno que activa las células, y otro que las inhibe. Los receptores citolíticos similares a la Ig (KIR) son receptores de linfocitos NK que transmiten una señal si se encuentran con moléculas de MHC de la clase I en una superficie celular. Esto es importante para eliminar tanto células cancerosas como células infectadas de forma viral. Dado que algunos

15 virus a menudo suprimen la expresión de MHC de la clase I en células que infectan, la célula infectada por el virus se llegaba a hacer susceptible a la eliminación por los linfocitos NK. Del mismo modo, las células cancerosas tienen una expresión de MHC reducida o no de la clase I y además, llegan a ser susceptibles de eliminación por los linfocitos NK. Los receptores naturales de citotoxicidad (NCR) constituyen una familia de receptores de activación de linfocitos NK. En algunos sistemas de efector-diana, la densidad superficial de los NCR se correlaciona con la actividad citolítica de los

20 linfocitos NK, mientras que en otros sistemas, la eliminación requiere cooperación entre NCR, otro receptor de activación NKG2D su polipéptido adaptador DAP10. Además, la intensidad de las señales se puede ver influenciada por el compromiso de los correceptores tales como 2B4 y NTB-A. Los ligandos para los NCR y NKG2D, hemaglutininas y MICA, MICB respectivamente no están expresados por la mayoría de las células normales, pero están inducidos en la mayoría de las líneas de células tumorales. La expresión de los ligandos por células tumorales desencadena una

25 respuesta inmune radical que da como resultado un rechazo a las células tumorales. Se ha mostrado que la activación de los linfocitos NK con IL-15 o IL-12 induce efectos tanto citotóxicos como proliferativos. Se ha demostrado que la molécula de adhesión de unión 2 (JAM2) se une a los linfocitos NK y se ha planteado la hipótesis de que desempeña un papel en la extravasación de linfocitos a sitios de inflamación.

30 Por lo tanto, un experimento de micromatriz de ADN que compara la expresión diferencial de genes de estos tres modos de activación con respecto a linfocitos NK en reposo tiene el potencial de revelar nuevos genes o nuevas asociaciones de genes con actividad de linfocitos NK. Se podrían desarrollar algunos anticuerpos terapéuticos, péptidos o moléculas pequeñas para dirigirse a genes específicos revelados por estas micromatrices para el tratamiento de enfermedades inflamatorias inmunes mediadas y tumores malignos. Los linfocitos NK de sangre

35 periférica se aislaron a partir de paquetes leucocitarios mediante selección negativa usando el kit de aislamiento de linfocitos NK con el sistema de clasificación de células magnético MACS™ (Miltenyi Biotec). La pureza celular se confirmó mediante tinción con PE anti-CD56 para análisis FACS. La pureza de las preparaciones de células varió de un 89 % a un 96 %. Cultivo celular: Montar cultivos *in vitro* en placas de 6 pocillos con 5 ml de cultivos/pocillo. Medio: RPMI 1640, FBS inactivado por calor al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, L-

40 glutamina 2 mM, y  $5,5 \times 10^{-5}$  de beta-mercaptoetanol. Tratamientos experimentales: Tiempo 0 horas, Células CD56(+) sin tratar. Tiempo 16 horas. Sin tratar, IL2 (10 nM), IL15 (10 nM), JAM-IT (10 nM) estimulado. La activación de los linfocitos NK se controló por FACS para expresión de la superficie celular de CD56 y CD69. En esta serie de experimentos se determinó que PRO87299 se expresa en los linfocitos NK CD56<sup>+</sup>, cuando se compara comparación con los linfocitos NK en reposo normales.

#### EJEMPLO 6: Uso de PRO87299 como una sonda de hibridación

El siguiente método describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO87299 como una sonda de hibridación.

50 El ADN que comprende la secuencia de codificación del PRO87299 de longitud completa o maduro como se desvela en el presente documento se usa como una sonda para identificar sistemáticamente los ADN homólogos (tal como las variantes de PRO87299 de origen natural de codificación) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

55 La hibridación y el lavado de los filtros que contienen cualquiera de los ADN de la biblioteca se realizan en las siguientes condiciones de rigurosidad elevada. La hibridación de la sonda derivada de PRO87299 radioetiquetada a los filtros se realiza en una solución de formamida al 50 %, SSC 5x, SDS al 0,1 %, pirofosfato sódico al 0,1 %, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardt 2x, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C durante 20 horas. El lavado de

60 los filtros se realiza en una solución acuosa de SSC 0,1x y SDS al 0,1 % a 42 °C.

Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifican la secuencia nativa de longitud completa de PRO87299 se pueden identificar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

EJEMPLO 7: Expresión de PRO87299 en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO87299 mediante expresión recombinante en *E. coli*.

5 La secuencia de ADN que codifica PRO87299 se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR aleccionados. Los cebadores deberían contener sitios de restricción enzimática que corresponden a los sitios de restricción enzimática en el vector de expresión seleccionado. Se pueden usar diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolívar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas con PCR se ligan a continuación en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor de *trp*, un líder de polyhis (incluyendo los primeros seis codones de STII, secuencia de polyhis, y sitio de escisión de enteroquinasa), la región de codificación de PRO87299, terminador de la transcripción lambda, y un gen *argU*.

15 La mezcla de ligación se usa a continuación para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. Los transformante se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y a continuación se seleccionan colonias de resistencia a antibióticos. El ADN de plásmido se puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

20 Los clones seleccionados se pueden cultivar durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo de cultivo LB complementado con antibióticos. El cultivo durante una noche se puede usar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se cultivan hasta una densidad óptica deseada, durante la que se activa el promotor de expresión.

25 Después de cultivar las células durante varias horas o más, las células se pueden cosechar mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido por la centrifugación se puede solubilizar usando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína de PRO87299 solubilizar se puede purificar a continuación usando una columna de quelación de metal en condiciones que permitan una unión estrecha de la proteína.

30 El PRO87299 se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO87299 se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de restricción enzimática que corresponden a los sitios de restricción enzimática en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles proporcionadas para inicio de la traducción eficaz y confiable, purificación rápida en una columna de quelación de metal, y retirada proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His, amplificadas por PCR se ligan a continuación en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan primero en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O.<sub>600</sub> de 3-5. A continuación, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado por mezcla de 3,57 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 g de citrato sódico•2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura de Difco, 5,36 g de hicasa SF Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO<sub>4</sub> 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30 °C con agitación. Las muestras se retiran para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE, y el cultivo en volumen se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta purificación y nuevo plegamiento.

45 Una pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (6-10 g de gránulos) se vuelve a suspender en 10 volúmenes (p/v) en tampón de guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetrionato sódico para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4 °C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en un Ultracentrífuga de Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón en columna de quelato de metal (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga en una columna con 5 ml de quelato de metal Ni-NTA de Qiagen equilibrada en el tampón de la columna de quelato de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye contaba con que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contiene la proteína deseada se combinan y almacenan a 4 °C. La concentración de proteínas se calcula mediante su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción basándose en su secuencia de aminoácidos.

60 Las proteínas se vuelven a plegar mediante dilución de la muestra lentamente en tampón de nuevo plegamiento recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de nuevo plegamiento se eligen de modo que la concentración final de la proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de nuevo plegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La reacción de nuevo plegamiento se inactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final de un 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de un 2-10 %. La proteína que se vuelve a plegarse se somete a cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con

65

- elución con un gradiente de acetonitrilo de un 10 a un 80 %. Las alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 se analizan en un geles de SDS poliacrilamida y las fracciones que contienen la proteína que se vuelve a plegar homogénea se combinan. Por lo general, las especies que se vuelven a plegar de forma apropiada de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Algunas especies agregadas se diluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo más elevadas. Además de resolver las formas de proteínas con plegamientos erróneos a partir de la forma deseada, la etapa de fase inversa también retira endotoxinas de las muestras.
- 10 Las fracciones que contienen el polipéptido PRO87299 plegado deseado se combinan y el acetonitrilo se retira usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4 % mediante diálisis o filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.
- 15 Los polipéptidos PRO87299 desvelados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

#### EJEMPLO 8: Expresión de PRO87299 en células de mamífero

- 20 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma de PRO87299 potencialmente glicosilada mediante expresión recombinantes en células de mamífero.

El vector, pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), se usa como el vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO87299 se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO87299 usando métodos de ligación tal como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente. El vector resultante se denomina pRK5-PRO87299.

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan hasta confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero bovino fetal y opcionalmente, componentes de nutrientes y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO87299 se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y disuelve en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,227 M. A esta mezcla se le añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO<sub>4</sub> 1,5 mM, y se permite que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se permite que seriamente durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se retira por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol al 20 % en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con el medio sin suero, se añade medio recién preparado y las células se incubaron durante aproximadamente 5 días.

40 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se sustituye con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-cisteína y 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-metionina. Después de un periodo de incubación de 12 horas, el medio condicionado se recoge, se concentra en un filtro de centrifugación, y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado se puede secar y exponer a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido PRO87299. Los cultivos que contienen células transfectados pueden experimentar una incubación adicional ( en medio sin suero) y el medio se somete a ensayo en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el PRO87299 se puede introducir en células 293 de forma transitoria usando el método de sulfato de dextrano descrito en Sompanyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se cultivan hasta una densidad máxima en un matraz de centrifugación y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO87299. Las células se concentran primero desde el matraz de centrifugación mediante centrifugación y lavado con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular, y se vuelven a introducir en el matraz de centrifugación que contiene medio de cultivo tisular, 5 µg/ml de insulina de bovino y 0,1 µg/ml de transferrina de bovino. Después de aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para retirar las células y los residuos. La muestra que contiene PRO87299 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el PRO87299 se puede expresar en células CHO. El pRK5-PRO97299 se puede transfectar en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO<sub>4</sub> o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar, y el medio se puede sustituir por medio de cultivo (solo) o medio que contiene una radioetiqueta tal como <sup>35</sup>S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO87299, el medio de cultivo se puede reemplazar con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incubaron durante aproximadamente 6 días, y a continuación el medio acondicionado se cosecha. El medio que contiene el PRO87299 expresado se puede concentrar a continuación y purificar con cualquier método seleccionado.

El PRO87299 etiquetado con epítipo también se puede expresar en células CHO hospedadoras. El PRO87299 se puede subclonar fuera del vector pRK5. La inserción del subclón se puede someter a PCR para fusionarse en un marco con una etiqueta de epítipo seleccionada tal como una etiqueta de poly-his en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de PRO87299 etiquetada con poly-his se puede subclonar a continuación en un vector que contiene promotor/potenciador de SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para selección de clones estables. Por último, las células CHO se pueden transfectar (como se ha descrito anteriormente) con el lector que contiene promotor/potenciador de SV40. El etiquetado se puede realizar, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO87299 etiquetado con poli-His expresados se puede concentrar a continuación y purificar con cualquier método seleccionado, tal como mediante cromatografía por afinidad de quelato de Ni<sup>2+</sup>.

El PRO87299 también se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO con otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias de codificación para las formas solubles (por ejemplo dominios extracelulares) de las respectivas proteínas se fusionan con una secuencia de región constante de IgG1 que contienen los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

Después de la amplificación con PCR, los respectivos ADN se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley y Sons (1997). Se construyen vectores de expresión de CHO para que tengan sitios de restricción compatibles en las posiciones 5' y 3' del ADN de interés para permitir el barajado conveniente de los ADNc. El vector usado en la expresión de células CHO es como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés e dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite selección para mantenimiento estable del plásmido después de transfección.

Doce microgramos del ADN de plásmido deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección Superfect<sup>®</sup> (Quiagen), Dospel<sup>®</sup> o Fugene<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim) disponibles en el mercado. Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, mencionado anteriormente. Aproximadamente  $3 \times 10^{-7}$  células se congelan en una ampolla para crecimiento y producción adicionales como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN de plásmido se descongelan mediante colocación en un baño con agua y se mezclan mediante agitación vorticial. Los contenidos se pipetean en un tubo de centrifuga que contienen 10 ml de medio es el centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se vuelven a suspender en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 µm con suero bovino fetal al 5 % diafiltrado a 0,2 µm). A continuación, se tomaron alícuotas de las células en una centrifugadora de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a una centrifugadora de 250 ml cargada con 150 ml de medios de crecimiento selectivo y se incuba a 37 °C. Después de otros 2-3 días, centrifugadoras de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con  $3 \times 10^5$  células/ml. El medio celular se intercambia con medios recién preparado mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede usar cualquier medio de CHO adecuado, realmente se puede usar un medio de producción descrito en la Patente de Estados Unidos n.º 5.122.469, presentada el 16 de junio de 1992. Una centrifugadora de producción de 3 l se siembra a  $1,2 \times 10^6$  células/ml. En el día 0, se determina el pH. En el día 1, se toman muestras de la centrifugadora y comienza la pulverización con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras de la centrifugadora, la temperatura se desplaza a 33 °C, y 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante la producción, el pH se ajusta cuando sea necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad haya caído por debajo de un 70 %, el cultivo celular se cosecha mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado se almacena a 4 °C o secará inmediatamente en columnas para purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican usando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de Ni-NTA 6 ml equilibrado en Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min. a 4 °C. después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. y se inicia la proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4 %, pH 6,8, con una columna de 25 ml de G25 Superfina (Pharmacia) y se almacena a -80 °C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir de los medios acondicionados como sigue a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrio antes de elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente mediante recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La

proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa congeles de SDS poliacrilamida y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante degradación de Edman.

- 5 Muchos de los polipéptidos PRO87299 desvelados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

#### EJEMPLO 9: Expresión de PRO87299 en Levadura

- 10 El siguiente método describe la expresión recombinante de PRO87299 en levadura.

En primer lugar, se construyen vectores de expresión de levadura a la producción o secreción intracelular de PRO87299 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO87299 y el promotor se insertan en sitios de restricción enzimática adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO87299.

- 15 Para secreción, el ADN que codifica PRO87299 se puede clonar en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifican el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de PRO87299 nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia señal/líder secretora de invertasa, y secuencias conectoras (si fuera necesario) para expresión de PRO87299.

- 20 A continuación, algunas células de levadura, tal como la cepa AB110 de levadura, se pueden transformar con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivar en medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura transformados se pueden analizar mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10 % y separación con SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con tinción con Azul de Coomassie.

- 25 El PRO87299 recombinante se puede aislar posteriormente y purificar retirando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y a continuación mediante concentración del medio usando filtros de cartuchos seleccionados. El concentrado que contiene PRO87299 se puede purificar adicionalmente usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

- 30 Muchos de los polipéptidos PRO87299 desvelados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

#### EJEMPLO 10: Expresión de PRO87299 en Células de Insecto Infectadas con Baculovirus

- 35 El siguiente método describe la expresión recombinante de PRO87299 en células de insecto infectadas con Baculovirus.

- La secuencia de codificación para PRO87299 fusión a cadena arriba de una etiqueta de epítipo contenida dentro de un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas de epítipo incluyen etiquetas de poly-his y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Se puede usar diversos plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia que codifica PRO87299 o la parte deseada de la secuencia de codificación de PRO87299 tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular se amplifica por PCR con cebadores complementarios con las regiones en las posiciones 5' y 3'. El cebador en la posición 5' puede incorporar sitios de restricción enzimática de flanqueo (seleccionados). A continuación, el producto se digiere con esas enzimas de restricción seleccionada si se subclona en el vector de expresión.

- 50 El baculovirus recombinante se genera mediante cotransfección del plásmido mencionado anteriormente y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (disponible en el mercado en GIBCO-BRL). Después de 4 - 5 días de incubación a 28 °C, los virus liberados se cosechan y se usan para amplificaciones adicionales. La infección y la expresión de proteína viral se realizan, se describe en O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

- A continuación, el PRO87299 expresado etiquetado con poly-his se puede purificar, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad con quelato de Ni<sup>2+</sup> como sigue a continuación. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus como se describe en Rupert *et al.*, Nature, 362: 175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 se lavan, se vuelven a suspender en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10 %; NP-40 al 0,1 %; KCl 0,4 M), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se eliminan por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 7,8) y se filtran a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (disponible en el mercado en Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta una medida inicial A<sub>280</sub> con tampón de carga, momento en el que comienza la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 6,0), que eluye la proteína no unido de forma específica. Después de alcanzar de nuevo la medida inicial A<sub>280</sub>, la columna se desarrolla con gradiente de Imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen

fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia de Western con Ni<sup>2+</sup>-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO87299 etiquetado con His<sub>10</sub> eluido se combinan y se dializan frente al tampón de carga.

- 5 Como alternativa, la purificación del PRO87299 etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) que incluyen por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Muchos de los polipéptidos PRO87299 desvelados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

10 EJEMPLO 11: Preparación de anticuerpos que se unen a PRO87299

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir a PRO87299 de forma específica.

- 15 En la técnica se conocen algunas técnicas para producir los anticuerpos monoclonales y se describen, por ejemplo, en Goding, mencionado anteriormente. Algunos inmunógenos que se pueden usar incluyen PRO87299 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO87299, y células que expresan PRO87299 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno la puede realizar el experto en la materia sin experimentación extensiva.

- 20 Los ratones, tal como Balb/c, se inmuniza con el inmunógeno de PRO87299 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. Como alternativa, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan de 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A partir de ese momento, durante varias semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener de forma periódica de los ratones mediante extracción de sangre retro-orbital para someter a ensayo en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO87299.

- 30 Después de haber detectado un título de anticuerpo adecuado, los animales "positivos" para anticuerpos se pueden inyectar con una inyección intravenosa final de PRO87299. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células del bazo se cosechan. Las células del bazo se fusionan a continuación (usando un 35 % de polietilenglicol) con una línea de células de mieloma murino seleccionadas tal como P3X63AgU.1, disponibles en ATCC, n.º CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que a continuación se pueden sembrar en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina, y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, que híbridos de células del bazo.

- 35 Las células de hibridoma se identificarán sistemáticamente en un ELISA para reactividad contra PRO87299. La determinación de las células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO87299 está dentro de la experiencia en la materia.

- 45 Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singeneicos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PRO87299. como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar en matraces de cultivo tisular o frascos giratorios. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis se puede conseguir usando precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía por exclusión en gel. Como alternativa, se puede usar cromatografía de afinidad basándose en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

50 EJEMPLO 12: Purificación de Polipéptidos PRO87299 Usando Anticuerpos Específicos

- Los polipéptidos PRO87299 nativos o recombinantes se pueden unificar mediante diversas técnicas convencionales en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO87299, polipéptido PRO87299 maduro, o polipéptido pre-PRO87299 se purifica mediante cromatografía de inmuoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO87299 de interés. En general, se construye una columna de inmuoafinidad mediante acoplamiento covalente del anticuerpo del polipéptido anti-PRO87299 a una resina de cromatografía activada.

- 60 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes ya sea mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fluido ascítico de ratón mediante precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une de forma covalente a una resina de cromatografía tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 65 Una columna de inmuoafinidad de este tipo se usa en la purificación del polipéptido PRO87299 preparando una

fracción de células que contienen el polipéptido PRO87299 en una forma soluble. Esta preparación se deriva mediante solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el polipéptido PRO87299 soluble que contiene una secuencia señal se puede secretar en cantidad fútil en el medio en el que se cultivan las células.

Una preparación que contiene polipéptido PRO87299 soluble se pasa sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lavan condiciones que permitan la absorbanca preferencial del polipéptido PRO87299 (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión de anticuerpo/polipéptido PRO87299 (por ejemplo, un tampón de pH bajo tal como pH aproximadamente 2-3, o una concentración elevada de un agente caótopo tal como urea o ión tiocianato), y el polipéptido PRO87299 se recoge.

#### EJEMPLO 13: Identificación Sistemática de Fármaco

La presente invención es particularmente útil para identificar sistemáticamente compuestos mediante el uso de los polipéptidos PRO87299 o fragmento de unión de los mismos en cualquiera de diversas técnicas de identificación sistemáticas de fármaco. El polipéptido PRO87299 o fragmento usado en un ensayo de este tipo puede estar libre en solución, fijado en un soporte sólido, transmitido en una superficie celular, o localizado por vía intracelular. Un método de identificación sistemática de fármaco usa células hospedadoras eucariotas o procariota es que se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento de PRO87299. Los fármacos se identifican sistemáticamente contra tales células transformadas en ensayos de unión competitiva. Tales células, ya sea en forma viable o fija, se pueden usar para ensayos de unión convencionales. Por ejemplo, se puede medir la formación de complejos entre el polipéptido PRO87299 o un fragmento y el agente que se está sometiendo ensayo. como alternativa, se puede examinar la disminución de la formación del complejo entre el polipéptido PRO87299 y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está sometiendo a ensayo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para identificar sistemáticamente fármacos o cualquier otro agente que pueda afectar a una enfermedad o trastorno asociados al polipéptido PRO87299. Estos métodos comprenden poner en contacto un agente de este tipo con un polipéptido PRO87299 o fragmento del mismo y someter a ensayo (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO87299 o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO87299 o fragmento y la célula, con métodos bien conocidos en la técnica. Ensayos de unión competitiva de este tipo, el polipéptido PRO87299 o fragmento por lo general está etiquetado. Después de una incubación adecuada, el polipéptido PRO87299 libre o fragmentos se separan del presente en forma unida, y la cantidad de etiqueta libre o que no forma complejo es una medida de la capacidad del agente en particular para unirse al polipéptido PRO87299 o para interferir con el complejo de polipéptido PRO87299/celular.

Otra técnica para identificación sistemática de fármaco proporciona identificación sistemática de alto rendimiento de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe con detalle en el documento WO84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Indicado en resumen, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de ensayo de péptidos pequeños en un sustrato sólido, tal como sugerencias de plástico u otro tipo de superficie. A la vez que se aplica a un polipéptido PRO87299, los compuestos de ensayo peptídicos reaccionan con el polipéptido PRO87299 y se lavan. El polipéptido PRO87299 unido se detecta con métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO87299 purificado también se puede revestir directamente en placas para uso en las técnicas de identificación sistemática de fármaco mencionadas anteriormente. Además, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

La presente invención también contempla el uso de ensayos de identificación sistemática de fármaco competitivos en los que los anticuerpos de neutralización capaces de unirse al polipéptido PRO87299 compiten de forma específica con un compuesto de ensayo para su unión al polipéptido PRO87299 o fragmentos del mismo. De este modo, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO87299.

#### EJEMPLO 14: Diseño Racional de Fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales del polipéptido biológicamente activo de interés (es decir, un polipéptido PRO87299) o de moléculas pequeñas con las que interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas, o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede usar para preparar fármacos que sean formas más activas o estables del polipéptido PRO87299 o que aumenten o interfieran con la función del polipéptido PRO87299 *in vivo* (c.f., Hodgson, Bio/Technology, 9\_: 19-21 (1991)).

En un enfoque, la estructura tridimensional del polipéptido PRO87299, o de un complejo de polipéptido PRO87299-inhibidor, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado por ordenador o, lo más habitualmente, mediante una combinación de los dos enfoques. Tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO87299 se deben discernir para elucidar la estructura y para determinar el sitio(s) activo de la molécula. Menos a menudo, la información útil con respecto a la estructura del polipéptido PRO87299 se puede conseguir mediante

5 modelado basándose en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, se usa una información estructural relevante para diseñar moléculas análogas similares al polipéptido PRO87299 o para identificar inhibidores eficaces. Algunos ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que tengan un aumento de la actividad o la estabilidad como se muestra en Braxton y Wells, *Biochemistry* 31: 7796-7801 (1992) o que actúen como inhibidores, agonistas, o antagonistas de péptidos nativos como se muestra en Athauda *et al.*, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).

10 También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado con ensayo funcional, como se ha descrito anteriormente, y a continuación resolver su estructura cristalina. En principio, este enfoque proporciona un farmacóforo sobre el que se puede basar el diseño posterior del fármaco. Es posible derivar la cristalografía de la proteína en conjunto para generar anticuerpos anti-idiotípicos (anti-ids) con respecto a un anticuerpo farmacológicamente activo, funcional. Como una imagen en un espejo de una imagen especular, se podría esperar que el sitio de unión de los anti-ids fuera un análogo del receptor original. A continuación, el anti-id se podría usar para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos por vía química o por vía biológica. Los péptidos aislados actuarían a continuación como el farmacóforo.

15 En virtud de la presente invención, las cantidades suficientes del polipéptido PRO87299 pueden llegar a estar disponibles para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO87299 proporcionada en el presente documento proporcionará directrices para los que usen técnicas de modelado informático en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

20 Se considera que la memoria descriptiva escrita mencionada anteriormente es suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. El alcance de la presente invención no se va a limitar por la construcción depositada, ya que la realización depositada se pretende como una sola ilustración de ciertos aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la presente invención. El depósito de material en el presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se debe interpretar como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción mencionada anteriormente.

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).  
5
2. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).
3. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 2 que consiste en la secuencia de codificación de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).  
10
4. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. El vector de la reivindicación 4 unido de forma operativa a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector.  
15
6. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 4 o 5.
7. La célula hospedadora de la reivindicación 6, en donde dicha célula es una célula de CHO, una célula de *E. coli* o una célula de levadura.  
20
8. Un proceso para producir un polipéptido PRO87299 con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 6 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido PRO87299 y recuperar dicho polipéptido PRO87299 del cultivo celular.  
25
9. Un polipéptido aislado que comprende (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).
10. Una molécula quimérica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.  
30
11. La molécula quimérica de la reivindicación 10, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una secuencia de etiqueta de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.
- 35 12. Un anticuerpo que se une de forma específica a un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico o a anticuerpo monocatenario.
- 40 14. Una composición de materia que comprende (a) un polipéptido de la reivindicación 9, o (b) un anticuerpo de las reivindicaciones 12 o 13, en combinación con un vehículo.
15. La composición de materia de la reivindicación 14, en la que dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.  
45
16. Un método para determinar la presencia de un polipéptido PRO87299 de acuerdo con la reivindicación 9 en una muestra de la que se sospecha que contiene dicho polipéptido, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a un anticuerpo anti-PRO87299 de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 y determinar la unión de dicho anticuerpo a un componente de dicha muestra.  
50
17. Un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero que está mediada por linfocitos T, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido PRO87299 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 % con (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, en donde un nivel de expresión más elevado de dicho gen en la muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativo de la presencia de dicha enfermedad relacionada con el sistema inmune en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.  
55
- 60 18. Un método para diagnosticar una respuesta inmune inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido PRO87299 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 % con (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, en donde un nivel de expresión más elevado de dicho gen en la muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas  
65

del mismo tipo celular es indicativo de la presencia de una respuesta inmune inflamatoria en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

5 19. Un método para diagnosticar linfoma en un mamífero, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido PRO87299 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 % con (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, en donde un nivel de expresión más elevado de dicho gen en la muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativo de la presencia de linfoma en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

15 20. Un método para diagnosticar enfermedad intestinal inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido PRO87299 que tiene una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 % con (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), en una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, en donde un nivel de expresión más elevado de dicho gen en la muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativo de la presencia de enfermedad intestinal inflamatoria en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

25 21. Un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero que está mediada por linfocitos T, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO87299 de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas de dicho mamífero y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido en la muestra de ensayo, en donde una cantidad mayor de complejos formados en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativa de la presencia de dicha enfermedad relacionada con el sistema inmune en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

30 22. Un método para diagnosticar una respuesta inmune inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO87299 de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas de dicho mamífero y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido en la muestra de ensayo, en donde una cantidad mayor de complejos formados en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativa de la presencia de dicha respuesta inmune inflamatoria en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

40 23. Un método para diagnosticar enfermedad intestinal inflamatoria en un mamífero, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO87299 de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas de dicho mamífero y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido en la muestra de ensayo, en donde una cantidad mayor de complejos formados en dicha muestra de ensayo en comparación con una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular es indicativa de la presencia de dicha enfermedad intestinal inflamatoria en el mamífero a partir del que se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

45 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en el que el polipéptido tiene una identidad de secuencias de al menos un 90 %, un 95 % o un 99 % con (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2); o  
50 en donde el polipéptido comprende (i) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

55 25. El método de las reivindicaciones 17 o 21, en el que dicha enfermedad relacionada con el sistema inmune es lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad renal mediada por el sistema inmune, una polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedad intestinal inflamatoria, una enfermedad cutánea autoinmune o mediada por el sistema inmune, una enfermedad asociada a trasplante, rechazo a injerto o enfermedad de injerto contra hospedador.

**FIGURA 1**

CCTCGGTTCTATCGATTGAATTCATGAAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAAC TGGGAAAT  
TATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGACATCTGGAACATCCATGGGAAAGAAT  
CATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATCTTAGCAGGAGATC  
CCTTTGAACTAGAAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCTCATGTGACTTGGTGCA  
AGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACCTTGAAGATAGACAAAACAAGTTGGAAGGAAGAGA  
AGAACATTTCATTTTTCATTCTACATTTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTCAT  
ACCGCTGTTCTGCAAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACCTTTTATG  
TGACAGATGTAAAAAGTGCTTCAGAACGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCT  
GGCTCCTGTATAGTTTACTTCCTTTGGGGGGATTGCCTCTACTCATCACTACCTGTTTCT  
GCCTGTTCTGCTGCCTGAGAAGGCACCAAGGAAAGCAAATGAACTCTCTGACACAGCAG  
GAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAAGCAAGCACCA  
GGCAAATTCCCAAGTACTGCTATCAGAAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTT  
GTTTCAGAATGCAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAAACAAC  
CAGGCATTGTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTCATTGGACTGAACTCAAGACTGGCAA  
GAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGGAGTTAAAGGATCCT  
CTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA  
GTGTTACAAATAAACAAATAATATTTCTCAATTTGAGAATTTTACTTTAGAAATGTTCA  
TGTTAGTGCTTGGGTCTGAAGGGTCCATAGGACAAATGATTAAAAAT

## **FIGURA 2**

MKTLPAMLGTGKLFVVFLLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPV  
KYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPLPNDNGSYRCSANFQ  
SNLIESHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLIITTCFLFCCLRR  
HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGS  
EVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

Secuencia señal  
ninguna

Dominio transmembrana  
153-173

Sitio de N-glicosilación .

75-78  
94-97  
110-113  
261-264

Sitio de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP .

41-44

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa .

31-39

Sitio de N-miristoilación .

111-116  
224-229  
254-259

Dominio de ITIM  
255-260

Dominio de ITISM  
280-285

Dominio de inmunoglobulina  
51-117