

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 731**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2004 PCT/US2004/037612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2006 WO06054961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2004 E 04822633 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1812465**

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2017

73 Titular/es:
GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
CLARK, HILARY;
EATON, DANIEL L.;
WRANIK, BERND;
OUYANG, WENJUN;
GONZALEZ, LINO;
LOYET, KELLY M. y
GURNEY, AUSTIN L.

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 602 731 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 inmunitario

5 **Campo de la invención**

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

10 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias son la manifestación o la consecuencia de rutas biológicas bastante complejas, a menudo interconectadas de forma múltiple, que en la fisiología normal son críticas para responder a la agresión o la lesión, iniciar la reparación de la agresión o la lesión, y organizan las defensas innata y adquirida frente a organismos extraños. La enfermedad o la patología se producen cuando estas rutas fisiológicas normales provocan agresión o lesión adicional ya sea relacionada de forma directa con la intensidad de la respuesta, como una consecuencia de la regulación anómala o la estimulación excesiva, como una reacción a lo propio, o como una combinación de estas.

Aunque la causas de estas enfermedades a menudo implica rutas de etapas múltiples y a menudo múltiples sistemas/rutas biológicas distintas, la intervención en puntos críticos de una o más de estas rutas puede tener un efecto de mejora o terapéutico. La intervención terapéutica puede producirse por ya sea antagonismo de un proceso/ruta perjudicial o por la estimulación de un proceso/ruta beneficioso.

Se conocen y se han estudiado extensamente muchas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. Tales enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias inmunomediadas, enfermedades inflamatorias no inmunomediadas, enfermedades infecciosas, enfermedades por inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

Los linfocitos T (células T) son un componente importante de la respuesta inmunitaria de un mamífero. Los linfocitos T reconocen antígenos que están asociados a una molécula propia codificada por genes en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, sigla del inglés *major histocompatibility complex*). El antígeno puede presentarse junto con las moléculas del MHC sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno, de células infectadas con virus, de células cancerosas, de 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 de forma extensa después del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC sobre una célula presentadora de antígeno. Los linfocitos T auxiliares también secretan diversas citocinas, es decir, linfocinas, que desempeñan un papel central en la activación de los linfocitos B, los linfocitos T citotóxicos y sobre otras diversas células que participan en la respuesta inmunitaria.

Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario podrían tratarse suprimiendo la respuesta inmunitaria. El uso de anticuerpos neutralizantes que inhiben moléculas que tienen actividad estimuladora inmunitaria sería beneficioso en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas e inflamatorias. Las moléculas que inhiben la respuesta inmunitaria pueden utilizarse (directamente proteínas o a través del uso de agonistas de anticuerpo) para inhibir la respuesta inmunitaria y mejorar así la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario.

Los linfocitos T CD4+ son conocidos como importantes reguladores de la inflamación. En el presente documento, se activaron linfocitos T CD4+ y se analizó el perfil de genes expresados de forma diferencial tras la activación. Como tal, los genes específicos de activación pueden ser dianas terapéuticas potenciales. La coestimulación *in vivo* es necesaria para una respuesta inmunitaria proliferativa productiva. El listado de las moléculas coestimuladoras es bastante extenso y todavía no está claro qué moléculas coestimuladoras desempeñan papeles críticos en los distintos tipos y fases de la inflamación.

La expresión trastorno inflamatorio intestinal ("TII") describe un grupo de trastornos inflamatorios crónicos de causas desconocidas, en los que el intestino se inflama, a menudo provocando calambres o diarrea recurrentes. La prevalencia del TII en los Estados Unidos se estima que es de aproximadamente de 200 en una población de 100.000. Los pacientes con TII se pueden dividir en dos grupos principales, aquellos con colitis ulcerosa ("CU") y aquellos con enfermedad de Crohn ("EC").

En los pacientes con CU, hay una reacción inflamatoria que implica principalmente a la mucosa del colon. Normalmente, la inflamación es uniforme y continua, sin áreas intermedias de mucosa normal. Las células de la superficie de la mucosa, así como el epitelio y la submucosa de las criptas, están implicados en una reacción inflamatoria con infiltración de neutrófilos. En última instancia, esta situación normalmente evoluciona hacia daño epitelial con pérdidas de células epiteliales dando como resultado múltiples ulceraciones, fibrosis, displasia y retracción longitudinal del colon.

65

La EC se diferencia de la CU en que la inflamación se extiende a través de todas las capas de la pared intestinal e implica al mesenterio, así como a los ganglios linfáticos. La EC puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo desde la boca hasta el ano. La enfermedad a menudo es discontinua, es decir, segmentos del intestino gravemente enfermos están alejados de zonas aparentemente libres de enfermedad. Además, en la CE la pared intestinal se engrosa, lo que conduce a obstrucciones. Además, no son inhabituales las fístulas y las fisuras.

Clínicamente, la TII se caracteriza por diversas manifestaciones que a menudo dan como resultado una evolución crónica impredecible. La diarrea hemorrágica y el dolor abdominal con frecuencia están acompañados de fiebre y pérdida de peso. No es inhabitual la anemia, como lo es la fatiga intensa. Las manifestaciones articulares que varían desde artralgia hasta artritis aguda, así como las anomalías en la función hepática, comúnmente se asocian al TII. Además, los pacientes con TII tienen un riesgo aumentado de carcinomas de colon, en comparación con la población general. Durante los "ataques" agudos del TII, el trabajo u otra actividad normal habitualmente son imposibles, y a menudo el paciente se hospitaliza.

Aunque la causa del TII permanece desconocida, se ha implicado a varios factores tales como la susceptibilidad genética, infecciosa e inmunológica. El TII es mucho más común en la raza blanca, en especial en los descendientes de judíos. La naturaleza inflamatoria crónica de la afección ha impulsado una búsqueda intensa de una posible causa infecciosa. Aunque se han encontrado agentes que estimulan la inflamación aguda, no se ha encontrado ninguno que provoque la inflamación crónica asociada al TII. La hipótesis de que el TII es una enfermedad autoinmunitaria está avalada por la manifestación extraintestinal del TII mencionada anteriormente, como la artritis articular, y la respuesta positiva conocida al TII por el tratamiento con agentes terapéuticos tales como glucocorticoides adrenales, ciclosporina y azatioprina, los cuales se sabe que suprimen la respuesta inmunitaria. Además, el tracto GI, más que cualquier otro órgano del cuerpo, está expuesto de forma continua a sustancias antigénicas potenciales tales como las proteínas de alimentos, subproductos bacterianos (LPS), etc.

Adicionalmente, el riesgo de cáncer de colon está altamente elevado en pacientes con colitis ulcerosa grave, en particular si la enfermedad ha existido durante varios años. Aproximadamente el 20-25 % de los pacientes con TII necesitan eventualmente cirugía para extirpar el colon debido a hemorragia masiva, la enfermedad debilitante crónica, perforación del colon o riesgo de cáncer. También en ocasiones se realiza cirugía cuando fallan otras formas de tratamiento médico o cuando los efectos secundarios de los esteroides u otros medicamentos amenazan la salud del paciente. Dado que la cirugía es invasiva y altera drásticamente la vida del paciente, no es un régimen de tratamiento altamente conveniente, y normalmente es el tratamiento de último recurso. Para comprender mejor esta enfermedad y posiblemente tratarla, los experimentos determinaron que un gen estaba regulado de forma positiva tanto en la EC como en la CU en comparación con el tejido normal.

Han *et al.*, J Immunology 172:5931-5939 (2004) se refiere a la expresión de BTLA y describe un anticuerpo anti BTLA que puede inhibir la activación de linfocitos T. Granger y Rickert, Cytokine & Growth factor Reviews 14:289-296 (2003) se refiere a la señalización de LIGHT-HVEM y la regulación de las respuestas inmunitarias de linfocitos T y describe el uso de un HVEM-Fc soluble en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario.

A pesar de los avances identificados anteriormente en la investigación de trastornos inmunitarios, existe una gran necesidad de agentes para el diagnóstico y terapéuticos adicionales que tengan la capacidad de detectar la presencia de trastornos inmunitarios en un mamífero y de reducir de forma eficaz estos trastornos. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención identificar y caracterizar un polipéptido con expresión aumentada en diversas células inmunitarias, implicado en diversos trastornos inmunitarios, y usar ese polipéptido, y los ácidos nucleicos que lo codifican, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y en la detección diagnóstica de trastornos inmunitarios en mamíferos.

50 Sumario de la invención

A. Realizaciones

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo seres humanos. La presente invención se basa en la identificación de proteínas (que incluyen anticuerpos agonistas y antagonistas) que son el resultado de la estimulación de la respuesta inmunitaria en mamíferos. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario se pueden tratar suprimiendo o potenciando la respuesta inmunitaria. Las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria estimulan o potencian la respuesta inmunitaria para un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmunitaria se pueden utilizar de forma terapéutica cuando la potenciación de la respuesta inmunitaria sea beneficiosa. Como alternativa, las moléculas que suprimen la respuesta inmunitaria que atenúan o reducen la respuesta inmunitaria para un antígeno (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) pueden utilizarse de forma terapéutica cuando la atenuación de la respuesta inmunitaria sea beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los polipéptidos PRO87299 y los antagonistas de los mismos son también útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y las inflamatorias. En un aspecto específico, tales medicinas y medicamentos comprenden una cantidad

terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de PRO87299 con un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la combinación está estéril.

5 En otra realización, la invención refiere a composiciones de materia que comprenden un anticuerpo antagonista de PRO87299 que se une al polipéptido en combinación con un vehículo o un excipiente. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Cuando la composición comprende una molécula estimuladora del sistema inmunitario, la composición es útil para: (a) aumentar la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero que lo necesite, (b) estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en un mamífero que lo necesite, (c) aumentar la proliferación de células inmunitarias en un mamífero que lo necesite en respuesta a un
10 antígeno, (d) estimular la actividad de células inmunitarias o (e) aumentar la permeabilidad vascular. La composición puede comprender un principio activo adicional, que puede, por ejemplo, ser un anticuerpo o un agente citotóxico o quimioterápico adicional. Preferentemente, la composición está estéril.

15 En otra realización, la invención tiene se refiere al uso médico de un anticuerpo antagonista de PRO87299 en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un mamífero que lo necesite, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de PRO87299 como se define en las reivindicaciones.

20 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une de forma específica a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o a continuación, como se define en las reivindicaciones. De manera opcional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monocatenario. En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une al polipéptido PRO87299. El anticuerpo inhibe o neutraliza la actividad de un polipéptido PRO87299 (un anticuerpo antagonista).
25 En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferentemente tiene restos de la región determinante de complementariedad (CDR) no humana y restos de la región marco conservada (FR) humana. El anticuerpo puede marcarse y puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo antiidiotipo.

30 En aún otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo antagonista anti PRO87299 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo. Preferentemente, la composición está estéril. La composición puede administrarse en forma de una formulación farmacéutica líquida, que puede conservarse para conseguir una estabilidad de almacenamiento extendida. Como alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un fragmento humanizado o un anticuerpo monocatenario.
35

En una realización adicional, la invención se refiere a un artículo de fabricación, que comprende:

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

45 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO87299 (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenida de un mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo celular, en las que un nivel de expresión más alto o más bajo en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad
50 relacionada con el sistema inmunitario en el mamífero a partir del cual se obtuvieron las células de tejido de prueba.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad inmunitaria en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti PRO87299 con una muestra de control 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 prueba; en el que la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia o ausencia de dicha enfermedad. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa y puede realizarse en comparación con el control de la formación del complejo en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo tipo celular. Una cantidad más grande de complejos formados en la muestra de prueba indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmunitaria en el mamífero a partir del cual las células de tejido de
55 prueba se obtuvieron. El anticuerpo preferentemente porta una marca detectable. La formación del complejo se puede controlar, por ejemplo, mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. La muestra de prueba habitualmente se obtiene de un individuo que se sospecha que tiene una deficiencia o anomalía en el sistema inmunitario.

65 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 prueba de células que se sospecha que contiene al

polipéptido PR087299 a un anticuerpo anti PR087299, y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra de células. En un aspecto específico, la muestra comprende una célula que se sospecha que contiene el polipéptido PR087299 y el anticuerpo se une a la célula. Preferentemente, el anticuerpo está marcado de forma detectable y/o está unido a un soporte sólido.

5 La presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, que comprende un anticuerpo anti PR087299 y un vehículo en un embalaje adecuado. Preferentemente, el kit contiene instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido PRO87299. Preferentemente el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que contiene un anticuerpo anti PR087299 en un embalaje adecuado. El kit preferentemente contiene instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar el polipéptido PR087299.

15 En otra realización, la invención proporciona un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero, que comprende detectar la presencia o ausencia de un polipéptido PR087299 en una muestra de prueba de células de tejido obtenida de dicho mamífero, en la que la presencia o ausencia del polipéptido PR087299 en dicha muestra de prueba es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en dicho mamífero.

20 En el presente documento se divulga un método para identificar un agonista de un polipéptido PR087299 que comprende:

- 25 (a) poner en contacto células y un compuesto de prueba para explorarlos en condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular normalmente inducida mediante un polipéptido PR087299; y
 (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un agonista eficaz, en la que la inducción de dicha respuesta celular es indicativa de que dicho compuesto de prueba es un agonista eficaz.

30 En el presente documento se divulga un método para identificar un compuesto que tiene la capacidad 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 tiempo suficientes para permitir que estos dos componentes interactúen, y determinar si se inhibe la actividad del polipéptido PR087299. En un aspecto específico, ya sea el compuesto candidato o el polipéptido PRO87299 se inmoviliza sobre un soporte sólido. En otro aspecto, los

35 componentes no inmovilizados portan una marca detectable. En un aspecto preferente, este método comprende las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto células y un compuesto de prueba para explorarlos en presencia de un polipéptido PR087299 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 prueba es un antagonista eficaz.

45 En el presente documento se divulga un método para identificar un compuesto que inhibe la expresión la expresión de un polipéptido PRO87299 en células que normalmente expresan el polipéptido, en el que el método comprende poner en contacto las células con un compuesto de prueba y determinar si se inhibe la expresión del polipéptido PR087299. En un aspecto preferente, este método comprende las etapas de:

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

55 En el presente documento se divulga un método para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un mamífero que padece el mismo, que comprende administrar al mamífero una molécula de ácido nucleico que codifica para ya sea (a) un polipéptido PRO87299, (b) un agonista de un polipéptido PR087299 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO87299, en el que dicho agonista o antagonista puede ser un anticuerpo anti PR087299. En una realización preferente el mamífero es un ser humano. En otra realización preferente, el ácido nucleico se administra a través de terapia génica *ex vivo*. En una realización preferente adicional, el ácido nucleico está comprendido en un vector, más preferentemente un vector adenovírico, vírico adenoasociado, lentivírico o retrovírico.

60

65 En el presente documento se divulga una partícula vírica recombinante que comprende un vector vírico que consiste en esencialmente un promotor, un ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO87299, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PR087299 o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO87299, y de una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, en el que el vector vírico está en asociación con proteínas estructurales víricas. Preferentemente, la secuencia señal es de un mamífero, tal como de un polipéptido PR087299

nativo.

5 En el presente documento se divulga una célula productora *ex vivo* que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa proteínas estructurales retrovíricas y también comprende un vector retrovírico que consiste esencialmente en un promotor, un 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 de una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, en la que dicha célula productora empaqueta al vector retrovírico en asociación con las proteínas estructurales para producir partículas retrovíricas recombinantes.

10 La invención se refiere a un método para aumentar la actividad de células inmunitarias 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 está aumentada la actividad de las células inmunitarias en un mamífero.

15 La invención se refiere a un método para aumentar la proliferación de células inmunitarias 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 está aumentada la proliferación de las células inmunitarias en un mamífero.

20 En el presente documento se divulga un método para disminuir la proliferación de células inmunitarias 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 está disminuida la proliferación de las células inmunitarias en un mamífero.

25 **B. Realizaciones adicionales**

30 En el presente documento se divulgan vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento. También se proporcionan las células hospedadoras que comprenden cualquiera de tales vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. Se proporciona adicionalmente un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

35 También se divulgan moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo. El ejemplo de tales moléculas quiméricas comprende cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados a una secuencia etiqueta de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

40 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une de forma específica a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o a continuación. De forma opcional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monocatenario.

45 También se divulgan sondas de oligonucleótido útiles para aislar secuencias de nucleótidos genómicas o de ADNc o como sondas antisentido, en las que las sondas pueden obtenerse de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente o a continuación.

Adicionalmente se divulgan moléculas de ácido nucleico aisladas que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO87299.

50 La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácidos nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
 55 aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
 60 aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
 65 aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos

aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que codifica un
5 polipéptido PRO87299 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se divulga en el
presente documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se divulga en el presente
documento, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se divulga en
el presente documento o cualquier otro fragmento definido de forma específica de la secuencia de aminoácidos de
longitud completa, como se divulga en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

10 Como alternativa, la molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tenga
al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
15 aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
20 aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
25 aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
30 aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que
comprende la secuencia codificante de un ADNC del polipéptido PR087299 de longitud completa, como se divulga en
el presente documento, careciendo la secuencia codificante de un polipéptido PR087299 del péptido señal como se
divulga en el presente documento, de la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido
35 PR087299 transmembrana, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento o de la secuencia
codificante de cualquier otro fragmento de la secuencia de aminoácidos de longitud completa definido de forma
específica, como se divulga en el presente documento, o con (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

40 La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tenga al menos
aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
45 aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
50 aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
55 aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una molécula de ADN que codifica el
60 mismo polipéptido maduro como se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO:2).

También se divulga una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que
codifica un polipéptido PRO87299 que tiene ya sea deletado el dominio transmembrana o inactivado el dominio
transmembrana, o es complementaria de tal secuencia de nucleótidos codificante, en la que el dominio (o dominios)
65 transmembrana de tal polipéptido se divulga en el presente documento. Por lo tanto, se contemplan dominios
extracelulares solubles de los polipéptidos PRO87299 descritos en el presente documento.

También se divulgan fragmentos de una secuencia que codifica el polipéptido PRO87299, o el complemento de la misma, que pueden hallar uso como, por ejemplo, sondas de hibridación, para fragmentos codificantes de un polipéptido PRO87299 que opcionalmente pueden codificar un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti PRO87299 o como sondas de oligonucleótido antisentido. Habitualmente, tales fragmentos de ácido nucleico son al menos aproximadamente de 20 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 30 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 40 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 50 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 60 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 70 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 80 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 90 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 100 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 110 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 120 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 130 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 140 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 150 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 160 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 170 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 180 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 190 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 200 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 250 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 300 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 350 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 400 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 450 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 500 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 600 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 700 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 800 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 900 nucleótidos de longitud y como alternativa al menos aproximadamente de 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos a la que se referencia más o menos el 10 % de la longitud a la que se hace referencia. Se señala que los fragmentos nuevos de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO87299 puede determinarse de una manera rutinaria, alineando la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido PRO87299 con otras secuencias de nucleótidos conocidas, utilizando cualquiera de varios de los programas de alineamiento de secuencias bien conocidos y determinando qué fragmento (o fragmentos) de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO87299 es nuevo. Todas de tales secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO87299 se contemplan en el presente documento. Además se contemplan los fragmentos de polipéptido PRO87299 que codifican estos fragmentos de molécula de nucleótidos, preferentemente los fragmentos del polipéptido PRO87299 que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti PRO87299.

También se divulga en el presente documento un polipéptido PRO87299 aislado que codifica cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas identificadas anteriormente en el presente documento.

El polipéptido PRO87299 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO87299 que tenga una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se divulga en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento o cualquier otro fragmento definido de forma específica de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se divulga en el presente documento.

El polipéptido PRO87299 aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 83 % de identidad de

5 secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO:2).

20 En el presente documento se divulga un polipéptido PR087299 aislado sin la secuencia señal N terminal y/o la metionina de iniciación y que está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de aminoácidos como se describió antes en el presente documento. También se describen en el presente documento los procesos para producir la misma, en los que los procesos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada, en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PR087299 y para recuperar el polipéptido PR087299 a partir del cultivo celular.

25 También se describe un polipéptido PRO87299 aislado que ya sea tiene deletado el dominio transmembrana o tiene inactivado el dominio transmembrana. Los procesos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en el que los procesos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada, en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PR087299 y para recuperar el polipéptido PRO87299 del cultivo celular.

30 En aún otra realización, la invención se refiere a antagonistas de un polipéptido PRO87299 nativo como se define en el presente documento, en el que el antagonista es un anticuerpo anti PRO87299.

35 En el presente documento se divulga un método para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO87299 que comprende poner en contacto al polipéptido PRO87299 con una molécula candidata y controlar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO87299. Preferentemente, el polipéptido PRO87299 es un polipéptido PRO87299 nativo.

40 En aún otra realización adicional, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo antagonista de un polipéptido PRO87299 como se describe en el presente documento, en combinación con un vehículo. De forma opcional, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Otra realización de la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo antagonista de un polipéptido PRO87299 como se describió anteriormente en el presente documento, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al anticuerpo antagonista de PRO87299.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de una secuencia nativa del ADNc de PR087299, en la que SEQ ID NO: 1 es un clon denominado en el presente documento como "DNA332467".

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) obtenida de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 mostrada en la Figura 1.

La Figura 3 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de una secuencia nativa del ADNc del HVEM (HVEM), en la que la SEQ ID NO: 3 es un clon denominado en el presente documento como "HVEM."

55 La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) obtenida de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 3 mostrada en la Figura 3.

La Figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de un LIGHT de secuencia nativa, en la que la SEQ ID NO: 5 es un clon denominado en el presente documento como "LIGHT."

60 La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) obtenida de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 5 mostrada en la Figura 5.

La Figura 7 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) de un PRO87299 de secuencia variante, en la que la SEQ ID NO: 7 es un clon denominado en el presente documento como "PRO87299.short."

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) obtenida de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 7 mostrada en la Figura 7.

65 La Figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) de un PRO87299 de secuencia variante, en la que la SEQ ID NO: 9 es un clon denominado en el presente documento como "PRO87299.AFTNIP."

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) obtenida de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 9 mostrada en la Figura 9.

La Figura 11 muestra variantes de ácido nucleico del ADNc de PRO87299.

La Figura 12 muestra la traducción polipeptídica de las variantes de PRO87299.

5 La Figura 13 muestra la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4+ T mediante anticuerpos agonistas.

La Figura 14 muestra la unión específica de PRO87299 a HVEM.

La Figura 15 muestra la unión de PRO87299 a HVEM cuando se lo compara con otros miembros de la familia.

Figura 16 muestra que la unión de PRO87299 a HVEM es sensible al pH.

La Figura 17 muestra la unión de PRO87299 a HVEM en células transfectadas con HVEM.

10 La Figura 18 muestra que los anticuerpos para PR087299 pueden bloquear la interacción con HVEM.

La Figura 19 muestra que PRO87299 y LIGHT pueden unirse a HVEM de forma simultánea.

La Figura 20 muestra que PR087299 no está bloqueado mediante la interacción de LIGHT con HVEM.

La Figura 21 muestra al péptido BP-2 y a gD bloqueando la interacción PRO87299/HVEM.

La Figura 22 muestra el efecto inhibitorio de PR087299 sobre linfocitos T CD4+.

15 La Figura 23 muestra que la activación de PRO87299 mediante HVEM-Fc promueve la supervivencia en un modelo de GVHR.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

20 I. Definiciones

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

30 Un "polipéptido PRO87299 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PRO87299 correspondiente obtenido de la naturaleza. Tales polipéptidos PRO87299 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o de síntesis. La expresión "polipéptido PRO87299 de secuencia nativa" abarca de forma específica formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido PRO87299 específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. Los polipéptidos PRO87299 de secuencia natural divulgados en el presente documento incluyen polipéptidos de secuencia natural maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras adjuntas. Los codones de inicio y de terminación se muestran en letra en negrita y están subrayados en las Figuras. Sin embargo, aunque el polipéptido PRO87299 divulgado en las figuras adjuntas se muestra que comienzan con restos metionina denominados en el presente documento como la posición de aminoácido 1 en las figuras, es concebible y posible que otros restos de metionina emplazados ya sea cadena arriba o cadena de la posición de aminoácido 1 en las figuras, se puedan emplear como el resto de aminoácido de inicio para los polipéptidos PRO87299.

45 El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido PRO87299 se refiere a una forma del polipéptido PRO87299 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático. Habitualmente, un ECD del polipéptido PRO87299 tendrá menos del 1 % de tales dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferentemente, tendrá menos del 0,5 % de tales dominios. Se comprenderá que cualquiera de los dominios transmembrana identificados para los polipéptidos PRO87299 de la presente invención se identifican conforme a los criterios empleados de forma rutinaria en la técnica para la identificación de ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos del dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se identificó de forma inicial en el presente documento. De forma opcional, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299 puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cada lado de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular, como se identifica en los Ejemplos o en la memoria descriptiva y tales polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y los ácidos nucleicos que los codifican, también se contemplan en la presente invención.

60 "Variante de polipéptido PRO87299" significa un polipéptido PRO87299 activo como se define anteriormente o a continuación, que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa como se divulga en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO87299 que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se divulga en el presente documento. Tales variantes del polipéptido PRO87299 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO87299 en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en los extremos N o C de la

secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Habitualmente, una variante del polipéptido PRO87299 tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa, al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia del polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa como se divulga en el presente documento, con una secuencia del polipéptido PR087299 que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, con un dominio extracelular de un polipéptido PR087299, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento, o con cualquier otro fragmento definido de forma específica de una secuencia de polipéptido PRO87299 de longitud completa como se divulga en el presente documento. Habitualmente, los polipéptidos variantes de PRO87299 son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 20 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 30 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 40 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 50 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 60 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 70 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 80 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 90 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 100 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 150 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 200 aminoácidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 300 aminoácidos de longitud, o más.

“Identidad de secuencia de aminoácidos porcentual (%)” con respecto a las secuencias del polipéptido PRO87299 identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia del polipéptido PRO87299 específica, tras el alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos, si fuese necesario, para conseguir la máxima identidad de secuencia porcentual, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para fines de la determinación de la identidad de secuencia de aminoácidos porcentual puede conseguirse de diversos modos que están dentro de las habilidades en la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático de ordenador disponible de forma pública, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias a comparar. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de la identidad de secuencia de aminoácidos % se generan utilizando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 lo creó Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el número de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos N.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible de forma pública a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se ajustan mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, la identidad de secuencia de aminoácidos % de una dada secuencia de aminoácidos A con respecto a, con, o frente a una dada secuencia de aminoácidos B (que puede como alternativa expresarse como una dada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende una determinada identidad de secuencia de aminoácidos % con respecto a, con, o frente a una dada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y
 en donde X es el número de restos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de A y B, y en donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará en donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual

a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, la identidad de secuencia de aminoácidos % de A con respecto a B no será igual a la identidad de secuencia de aminoácidos % de B con respecto a A. Como ejemplos de los cálculos de identidad de secuencia de aminoácidos % utilizando este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular la identidad de 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, la "Proteína de Comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al que el polipéptido "PRO87299" de interés se está comparando, y "X", "Y" y "Z", representa cada uno distintos restos de aminoácidos hipotéticos.

10 A menos que se indique otra cosa de forma específica, todos los valores de identidad de secuencia de aminoácidos % utilizados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente, utilizando el programa de ordenador ALIGN-2. Sin embargo, los valores de identidad de secuencia de aminoácidos % también se pueden obtener como se describe a continuación utilizando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a los valores predeterminados. Los que no se ajustan a los valores predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores: extensión de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11 y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, un valor de identidad de secuencia de aminoácidos % se determina dividiendo (a) el número de restos de aminoácido idénticos que coinciden entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO87299 de interés que tiene una secuencia obtenida del polipéptido PRO87299 nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que el polipéptido PRO87299 de interés se está comparando, que puede ser un polipéptido variante de PRO87299) como se determina mediante WU-BLAST-2 por (b) el número total de restos de aminoácido del polipéptido PRO87299 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene o teniendo al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a 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.

30 La identidad de secuencia de aminoácidos porcentual también puede determinarse utilizando 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 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o se puede obtener de otra forma del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se ajustan a los valores predeterminados que incluyen, por ejemplo, no enmascarar = sí, cadena = todas, apariciones esperadas = 10, longitud de baja complejidad mínima = 15/5, valor e de pases múltiples = 0,01, constante para multipases = 25, reducción para el alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

40 En las situaciones en donde se emplea NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, la identidad de secuencia de aminoácidos % de una dada secuencia de aminoácidos A con respecto a, con, frente a, una dada secuencia de aminoácidos B (que puede como alternativa expresarse como una dada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende una determinada identidad de secuencia de aminoácidos % con respecto a, con, o frente a una dada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

45 en donde X es el número de restos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento del programa de A y B, y en donde Y es el número total de restos de aminoácido en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, la identidad de secuencia de aminoácidos % de A con respecto a B no será igual a la identidad de secuencia de aminoácidos % de B con respecto a A.

50 "Polinucleótido variante de PRO87299" o "secuencia de ácido nucleico variante de PRO87299" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO87299 activo como se define a continuación y que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleotídico que codifica una secuencia de polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa, como se divulga en el presente documento, una secuencia de polipéptido PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO87299, con y sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO87299 de longitud completa como se divulga en el presente documento. Habitualmente, un polinucleótido variante de PRO87299 tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente el 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos

- aproximadamente el 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
5 aproximadamente el 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
10 aproximadamente el 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente el 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente el 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que
codifica una secuencia del polipéptido PR087299 de secuencia nativa de longitud completa, como se divulga en el
presente documento, una secuencia nativa de longitud completa de la secuencia del polipéptido PR087299 que
15 carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido
PRO87299, con o sin la secuencia señal, como se divulga en el presente documento o cualquier otro fragmento de
una secuencia del polipéptido PR087299 de longitud completa como se divulga en el presente documento. Las
variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.
- 20 Habitualmente, los polinucleótidos variantes de PR087299 son al menos de 30 nucleótidos de longitud, como
alternativa al menos aproximadamente de 60 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente
de 90 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 120 nucleótidos de longitud, como
alternativa al menos aproximadamente de 150 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente
25 de 180 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 210 nucleótidos de longitud, como
alternativa al menos aproximadamente de 240 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente
de 270 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 300 nucleótidos de longitud, como
alternativa al menos aproximadamente de 450 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente
de 600 nucleótidos de longitud, como alternativa al menos aproximadamente de 900 nucleótidos de longitud, o más.
- 30 "Identidad de secuencia de ácido nucleico porcentual (%)" con respecto a las secuencias de ácido que codifican
PRO87299 identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia
candidata que es idéntico a los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de PR087299 de interés, tras el
alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos, si es necesario, para conseguir la máxima identidad de
secuencia porcentual. El alineamiento con el objetivo de determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico
35 porcentual se puede conseguir de diversos modos que están dentro de las habilidades en la técnica, por ejemplo,
utilizando un programa informático de ordenador disponible de forma pública tal como el programa informático
BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores
de identidad de secuencia de ácido nucleico % se generan utilizando el programa de ordenador de comparación de
secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a
40 continuación. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 tiene lo creó Genentech, Inc. y el
código fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la
Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el n.º
de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible de forma
pública a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente
45 proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema
operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se
ajustan por el programa ALIGN-2 y no varían.
- 50 En situaciones en donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácido nucleico, la identidad
de secuencia de ácido nucleico % de una dada secuencia de ácido nucleico C con respecto a, con, o frente a una
dada secuencia de ácido nucleico D (que puede como alternativa expresarse como una dada secuencia de ácido
nucleico C que tiene o comprende una determinada identidad de secuencia de ácido nucleico % con respecto a, con,
o frente a una dada secuencia de ácido nucleico D) se calcula como sigue:
- 55 100 veces la fracción W/Z
en donde W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de
alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento del programa de C y D, y en donde Z es el número total
de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es equivalente
60 a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, la identidad de secuencia de ácido nucleico % de C con
respecto a D no será igual a la identidad de secuencia de ácido nucleico % de D con respecto a C. Como
ejemplos de cálculos de la identidad de secuencia de ácido nucleico %, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo
calcular la identidad de secuencia de ácido nucleico % de la secuencia de ácido nucleico denominada "ADN de
Comparación" con respecto a la secuencia de ácido nucleico denominada "PRO87299-DNA", en la que
"PRO87299-DNA" representa una secuencia de ácido nucleico que codifica PRO87299 hipotética de interés,
65 "ADN de Comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que
la molécula de ácido nucleico "PRO87299-DNA" de interés se está comparando, y "N", "L" y "V" representa cada

uno distintos nucleótidos hipotéticos.

A menos que se establezca otra cosa de forma específica, todos los valores de identidad de secuencia de ácido nucleico % utilizados en el presente documento se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente precedente, utilizando el programa de ordenador ALIGN-2. Sin embargo, los valores de identidad de secuencia de ácido nucleico % también pueden obtenerse como se describe a continuación, utilizando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a valores predeterminados. Los que no se ajustan a valores predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan con los siguientes valores; extensión de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11 y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor de identidad de secuencia de ácido nucleico % dividiendo (a) el número de nucleótidos que coinciden idénticos entre la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 de interés que tiene una secuencia obtenida del ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 de secuencia nativa y la comparación de la molécula de ácido nucleico de interés (es decir, la secuencia frente a la que la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 de interés se está comparando, la cual puede ser un polinucleótido PR087299 variante) como se determina mediante WU-BLAST-2 por (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que tiene o teniendo al menos el 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a la secuencia de ácido nucleico B", la secuencia de ácido nucleico A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácido nucleico B es la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 de interés.

La identidad de secuencia de ácido nucleico porcentual también puede determinarse utilizando 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 se puede obtener de otra forma del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se ajustan a valores predeterminados que incluyen, por ejemplo, no enmascarar = si, cadena= todas, apariciones esperadas = 10, longitud de baja complejidad mínima = 15/5, valor e de pases múltiples = 0,01, constante para pases múltiples = 25, caída para el alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en donde se emplea para las comparaciones de secuencias NCBI-BLAST2, la identidad de secuencia de ácido nucleico % de una dada secuencia de ácido nucleico C con respecto a, con o frente a una dada secuencia de ácido nucleico D (la cual puede como alternativa expresarse como una dada secuencia de ácido nucleico C que tiene o que comprende una determinada identidad de secuencia de ácido nucleico % con respecto a, con o frente a una dada secuencia de ácido nucleico D) se calcula como sigue:

100 veces la fracción W/Z

en donde W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el alineamiento del programa de C y D, y en donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, la identidad de secuencia de ácido nucleico % de C con respecto a D no será igual a la identidad de secuencia de ácido nucleico % de D con respecto a C.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de PR087299 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PR087299 activo y el cual tiene la capacidad de hibridar, preferentemente en condiciones de hibridación y lavado rigurosas, con las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PR087299 de longitud completa, como se divulga en el presente documento. Los polipéptidos variantes de PR087299 pueden ser los que codifica un polinucleótido variante de PR087299.

"Aislado", cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos divulgados en el presente documento, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna, mediante el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras, utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido dentro de células recombinantes *in situ*, dado que al menos un componente del entorno natural del polipéptido PR087299 no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica el polipéptido PR087299 "aislado" u otro ácido nucleico que codifica polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica polipéptido. Una molécula de

ácido nucleico que codifica polipéptido aislada es una que no es la forma o contexto en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptido aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido específica tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptido contenidas en células que habitualmente expresan el polipéptido en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en un emplazamiento cromosómico distinto del de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, de forma opcional una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder de secreción está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son continuas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura abierta. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligamiento en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótido sintéticos en conformidad con la práctica convencional.

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

Un experto en la materia puede determinar fácilmente la "rigurosidad" de las reacciones de hibridación y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sales. En general, las sondas más largas necesitan mayores temperaturas para un apareamiento apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación en general depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para reaparearse cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuando mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer más rigurosas las condiciones de la reacción, mientras que temperaturas menores las harían menos rigurosas. Para detalles y explicaciones adicionales sobre la rigurosidad de las reacciones de hibridación véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se define en el presente documento, puede identificarse como las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con seroalbúmina bovina al 0,1 %/ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (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 de sodio/citrato de sodio) 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.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" se pueden identificar como 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 una 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 de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, sulfato de dextrano al 10 % y ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de onda y similares.

La expresión "etiquetado con epítipo" cuando se utiliza en 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 para proporcionar un epítipo frente al que se puede preparar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de forma que no interfiera con la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido etiqueta preferentemente también es bastante exclusivo de forma que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados en general tienen al menos seis restos de aminoácido y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácido (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácido).

5
10 Como se utiliza en el presente documento, el término "inmuno adhesina" denomina moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que no sea el sitio de reconocimiento antigénico y de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de una
15 inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse 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.

20 "Activo" o "actividad" para los fines del presente documento se refiere a la forma (o formas) de un polipéptido PRO87299 que conserva una actividad biológica y/o una inmunológica de PRO87299 nativa o de origen natural, en el que actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibidora o estimuladora) provocada por un PRO87299 nativo o de origen natural, que no sea la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseída por un PRO87299 nativo o de origen natural, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseída por un PRO87299
25 nativo o de origen natural.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquea de forma parcial o completa, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido PRO87299 nativo divulgado en el presente documento. De manera similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido PRO87299 nativo divulgado en el presente documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen de forma específica anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos PRO87299 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para
30 identificar agonistas o 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 al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o frenar (disminuir) la afección o trastorno patológico que se tiene como objetivo. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los que tienen tendencia a tener el trastorno o aquellos en los que se quiere prevenir el trastorno.
40

Administración "crónica" se refiere a la administración del agente (o agentes) en un modo continuo en oposición a un modo agudo, de forma que se mantenga el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es más bien de naturaleza cíclica.
45

"Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológicos, de deportes o mascotas, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
50

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.
55

"Vehículos" como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que sean no tóxicos para la célula o el mamífero que se expone al mismo, a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen el ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; polialcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.
60
65

"Fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizarse rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y todavía es capaz de entrecruzar antígeno.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. De forma colectiva, los seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión entero.

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 difieren de los fragmentos Fab' en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para Fab' en el cual el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, a base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

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

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L, que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen de forma más completa en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161 y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina mediante el método de Lowry, y muy preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna, mediante el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras utilizando 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. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

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

La palabra "marcador", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición

detectable que está conjugado de forma directa o indirecta al anticuerpo de forma que se genere un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable en sí (por ejemplo marcadores de radioisótopo o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química que sea detectable de un compuesto o composición sustrato.

5 Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que el anticuerpo de la presente invención se puede adherir. Los ejemplos de fases sólidas abarcados en el presente documento incluyen los formados de forma parcial o completa de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En determinadas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida
10 puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta frase incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 4.275.149.

15 Un "liposoma" es una vesícula pequeña que consta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para la entrega de un fármaco (tal como un polipéptido PRO87299 o anticuerpo del mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma comúnmente se disponen en una formación en bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

20 Una "molécula pequeña" se define en el presente documento por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

25 La expresión "enfermedad relacionada con el sistema inmunitario" significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero provoca, media o contribuye de otra forma a una morbilidad en el mamífero. También están incluidas las enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto de mejora en la evolución de la enfermedad. Están incluidas dentro de esta frase las enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario, las enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmunitario, las enfermedades infecciosas, las enfermedades de inmunodeficiencia, la neoplasia, etc.

30 La expresión "enfermedad mediada por linfocitos T" significa una enfermedad en la que los linfocitos T median de forma directa o indirecta, o contribuyen de otra forma, a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por linfocitos T puede estar asociada a efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados a linfocitos B si se estimulan linfocitos B, por ejemplo, mediante las linfocinas que secretan los linfocitos T.

35 Los ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por el sistema inmunitario o los linfocitos T, que pueden tratarse 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 Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmunomediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal inmunomediada (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
45 como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmunitaria, 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 de la piel autoinmunitarias o inmunomediadas que incluyen enfermedades de la piel vesiculares, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica,
50 dermatitis atópica, hipersensibilidad alimentaria y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como las neumonías eosinófilas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante que incluyen rechazo de injerto y enfermedad del injerto contra el hospedador. Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades víricas tales como el SIDA (infección por VIH), las hepatitis A, B, C, D, y E, el herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoarias e infecciones parasitarias.

55 La expresión "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO87299 y/o de un agonista/antagonista que da como resultado el logro de un estado establecido particular. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido PRO87299 o agonista o antagonista del mismo puede determinarse de forma empírica. Además, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO87299 y/o
60 agonista/antagonista que sea eficaz para conseguir un efecto terapéutico estipulado. Esta cantidad puede determinarse de forma empírica también.

65 La expresión "agente citotóxico" como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterápicos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido),

doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina y otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación. Se describen a continuación otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales. Las citotoxinas pueden acoplarse covalentemente a un anticuerpo para dirigir la toxina a una célula particular de interés que expresa el antígeno. Las citotoxinas útiles y sus enlazadores incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

10 ENLAZADORES:

MC = maleimidocaproilo

Val Cit = valina-citrulina, sitio dipeptídico en el enlazador escindible por proteasa.

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanoico

15 PAB = p-aminobencilcarbamoilo (porción "autoinmolativa" del enlazador)

Me = N-metil-valina citrulina en donde el enlace del péptido enlazador se ha modificado para evitar su escisión por catepsina B

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproil-polietilenglicol, acoplado a cisteínas del anticuerpo.

SPP = N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato

20 SMCC = N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono-metil auristatina E (PM 718)

25 MMAF = variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C del fármaco (PM 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en una unión amida en la fenilalanina C terminal (PM 801,5)

30 MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado en la fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, acoplado como una amida en el extremo C de MMAF

35 AEVB = auristatina E valeril bencilhidrazona, enlazador ácido inestable a través del extremo C de AE (PM 732)

AFP = Auristatina F fenilendiamina; (la variante de fenilalanina unida al anticuerpo a través del extremo C a través de un espaciador de fenilendiamina) (PM 732).

40 Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe ya sea *in vitro* o *in vivo* el crecimiento de una célula. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce de forma significativa el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto que no es la fase S), tal como los agentes que inducen la detención en G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como la doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden hasta la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders:Philadelphia, 1995), en especial p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos obtenidos ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), obtenido del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblado de los microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

Un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citocina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de Estados Unidos n.º 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También están incluidos en esta definición los agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas en tumores tales como tamoxifeno y onapristona.

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan como

mediadores intercelulares sobre otra célula. Los ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Están incluidos entre las citocinas las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; las hormonas de glucoproteína tales como la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona tiroestimulante (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral α y β ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; el factor de crecimiento similar a insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; los interferones tales como interferón α , β , y γ , los factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se utiliza en el presente documento, el término citocinas incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Como se utiliza en el presente documento, el término "inmuno adhesina" denomina moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de las inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que no es el sitio de reconocimiento y unión al antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de las inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente 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 puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tales 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 utiliza en el presente documento, la expresión "células inflamatorias" denomina células que potencian 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},
/* 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},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

```

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

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

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

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

struct diag {
    int            score;     /* score at last jmp */
    long           offset;    /* offset of prev block */
    short          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();

```

```

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

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

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

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

```

```

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

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

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

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

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

...NW

```

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

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

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

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

```

...NW

```

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

```

```

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

#include "nw.h"

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

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

print()

{
    print

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

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

```

```

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

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

```

```

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

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

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[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

```

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

...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 == '\t')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
```

nums

```
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
```

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

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

/* these count from 1:
 * nij[] 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] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (j = lmax+P_SPC; j; j--)
        *px++ = ' ';

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

```

```
/*
 * 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));
}
```

```

/*
 * 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';
}

```

...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 = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...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;
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
    writejumps
    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);
}

```

5

		<u>Tabla 2</u>	
PRO87299	XXXXXXXXXXXXXXXXXX		(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de Comparación	XXXXXXXXYYYYYYY		(Longitud = 12 aminoácidos)
Identidad de secuencia de aminoácido % =			

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

10

		<u>Tabla 3</u>	
PRO87299	XXXXXXXXXXXX		(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de Comparación	XXXXXXXXYYYYZZYZ		(Longitud = 15 aminoácidos)
identidad de secuencia de aminoácido % =			

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

15

		<u>Tabla 4</u>	
PRO87299-DNA	NNNNNNNNNNNNNN		(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de Comparación	NNNNNNLLLLLLLLL		(Longitud = 16 nucleótidos)

Identidad de secuencia de ácido nucleico % =
 20 (el número de nucleótidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico como se determinó por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de PRO87299-DNA) = 6 dividido por 14 = 42,9 %

25

		<u>Tabla 5</u>	
PRO87299-DNA	NNNNNNNNNNNN		(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de Comparación	NNNNLLLVV		(Longitud = 9 nucleótidos)

Identidad de secuencia de ácido nucleico % =
 30 (el número de nucleótidos que coinciden de forma idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico como se determinó por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de PRO87299-DNA) = 4 dividido por 12 = 33,3 %

II. Composiciones y métodos de la invención

A. Polipéptidos PRO87299 de longitud completa

- 5 La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican polipéptidos denominados en la presente solicitud como polipéptidos PRO87299. En particular, se han identificado y aislado ADNc que codifican diversos polipéptidos PRO87299, como se divulga con mayor detalle en los Ejemplos a continuación.
- 10 Un experto en la materia puede determinar fácilmente las secuencias de nucleótidos reales de los clones secuenciando el clon depositado utilizando métodos de rutina en la técnica. La secuencia de aminoácidos predicha se puede determinar a partir de la secuencia de nucleótidos utilizando técnicas habituales. Para los polipéptidos PRO87299 y los ácidos nucleicos codificantes descritos en el presente documento, los solicitantes han identificado lo que se cree que es la fase de lectura abierta que se puede identificar mejor con la información de 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 puedan preparar variantes de PRO87299. Las variantes de PRO87299 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO87299, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO87299 deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden modificar los procesos postraduccionales del PRO87299, tal como el cambio del número o la posición de los sitios de glucosilación o la modificación de las características del anclaje en membrana.

25 Las variaciones en PRO87299 de secuencia de longitud completa nativa o en diversos dominios de PRO87299 descritas en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas indicadas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican a PRO87299, que dan como resultado el cambio en la secuencia de aminoácidos de PRO87299 en comparación con PRO87299 de secuencia nativa. De forma opcional, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más dominios del PRO87299. La guía para determinar qué resto de aminoácido debe insertarse, sustituirse o seleccionarse sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar comparando la secuencia del PRO87299 con la de las moléculas de proteína conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado del reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina por una serina, es decir, reemplazos de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden opcionalmente estar en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo de forma sistemática inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y analizando las variantes resultantes para la actividad que presente la secuencia nativa de longitud completa o madura.

45 Los fragmentos del polipéptido PRO87299 se proporcionan en el presente documento. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se los compara con una proteína nativa de longitud completa. Determinados fragmentos carecen de restos de aminoácido que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO87299.

50 Los fragmentos de PRO87299 se pueden preparar mediante cualquiera de varias técnicas convencionales. Los fragmentos de péptido deseados pueden sintetizarse de forma química. Una estrategia alternativa implica generar fragmentos de PRO87299 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por restos de aminoácido particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando al fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento del polipéptido deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseado del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos del polipéptido PRO87299 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO87299 nativo divulgado en el presente documento.

60 Las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezado de sustituciones preferentes. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen los productos explorados más cambios sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos.

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

Las modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica del polipéptido PR087299 se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos a base de propiedades comunes de las cadenas laterales:

- 5
- 10
- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
 (3) ácidos: asp, glu;
 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 (5) restos que influyen la orientación de cadena: gly, pro; y
 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también pueden introducirse en sitios de sustitución conservativos o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

20

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

25

30

También se puede emplear para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua el análisis de aminoácido por rastreo. Entre los aminoácidos de rastreo preferentes están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. Normalmente, la alanina es un aminoácido de rastreo preferente entre este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. Normalmente, la alanina también es preferente debido a que es el aminoácido más común. Adicionalmente, se encuentra con frecuencia tanto en posiciones ocultas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución por alanina no produce

cantidades adecuadas de la variante, se puede utilizar un aminoácido isoestérico.

C. Modificaciones de PRO87299

5 Están incluidas las modificaciones covalentes de PRO87299. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácido que se tienen como objetivo de un polipéptido PRO87299 con un agente de derivatización orgánico que tenga la capacidad de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales de PRO87299. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento de PRO87299 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en el método
10 para purificar anticuerpos anti PRO87299, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento utilizados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo disuccinimidil ésteres tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-áridofenil)ditio]propioimidato.

15 Otras modificaciones incluyen la deaminación de restos glutaminilo y asparraginilo a los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la metilación de grupos α -amino de las cadenas laterales de la lisina, la arginina y la histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86
20 (1983)], la acetilación de amina N terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO87299 incluido comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación nativo" tiene por objeto significar, para los fines en el presente documento, la delección de uno o más residuos de hidratos de carbono encontrados en la secuencia nativa
25 de PRO87299 (ya sea mediante la eliminación del sitio de glucosilación subyacente o por la delección de la glucosilación mediante medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en PRO87299 de secuencia nativa. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos residuos de hidratos de carbono presentes.

30 La adición de sitios de glucosilación al polipéptido PRO87299 se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede hacer, por ejemplo, mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en PRO87299 de secuencia nativa (para los sitios de glucosilación unidos en O). La secuencia de aminoácidos de PRO87299 puede, de forma opcional, alterarse a través de cambios al nivel de ADN, en particular mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO87299 en bases preseleccionadas de modo
35 que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de residuos de hidrato de carbono en el polipéptido PRO87299 son mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por
40 ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

La eliminación de residuos de hidratos de carbono presentes en el polipéptido PRO87299 se puede llevar a cabo por sustitución química o enzimática o mediante sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos
45 que sirven como dianas para la glucosilación. Las técnicas químicas de glucosilación son conocidas en la técnica 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 los residuos de hidratos de carbono en polipéptidos se puede conseguir mediante el uso de diversas endo y hexoglucosidasas, como se describe en Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

50 Otro tipo de modificación covalente de PRO87299 comprende unir el polipéptido PRO87299 a uno de varios polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera que se indica en las patentes de Estados Unidos N.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

55 PRO87299, como se define en el presente documento, también puede modificarse de un modo para formar una molécula quimérica que comprende fusionar PRO87299 con otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

Tal molécula quimérica puede comprender una fusión de PRO87299 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que un anticuerpo anti etiqueta puede unirse de forma selectiva. La etiqueta de epítipo en general se
60 coloca en el extremo amino o carboxilo de PRO87299. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del PRO87299 se puede detectar utilizando un anticuerpo frente al polipéptido etiqueta. Además, la proporción de la etiqueta de epítipo permite que PRO87299 se purifique de forma fácil mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la etiqueta de epítipo. Se conocen en la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5
65

[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 ellos [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)] y la etiqueta glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido-Etiqueta [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido epítipo de alfa-tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)] y la etiqueta de péptido de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

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

D. Preparación de PRO87299

La descripción a continuación se refiere principalmente a la producción de PRO87299 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO87299. Por supuesto se contemplan que se pueden emplear para preparar PRO87299 métodos alternativos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de PRO87299, porciones de la misma, se puede producir mediante síntesis de péptidos directa utilizando técnicas en 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 proteína *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar de forma química diversas porciones de PRO87299, de forma separada, y combinarlas utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir el PRO87299 de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica PRO87299

El ADN que codifica PRO87299 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO87299 y que lo expresa en 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).

Las bibliotecas se pueden explorar 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 que codifica. El cribado de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos convencionales, tales como los descritos 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 es utilizar metodología de PCR [Sambrook *et al.*, citado anteriormente; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los Ejemplos a continuación describen técnicas para el cribado de una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de un largo suficiente y suficientemente no ambiguas de modo que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido preferentemente está marcado de forma que pueda detectarse en la hibridación al ADN en la biblioteca que se está explorando. Los métodos de marcaje son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. En Sambrook *et al.*, citado anteriormente, se proporcionan las condiciones de la hibridación, incluyendo la rigurosidad moderada y la rigurosidad elevada.

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

El ácido nucleico que tiene una secuencia codificante de proteína se puede obtener mediante cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas, utilizando la secuencia de ácido nucleico deducida divulgada en el presente documento por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos de extensión de cebador convencionales, como se describe en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, para detectar precursores e intermediarios de

procesamiento de ARNm que puedan no haberse transcrito de forma inversa a ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedadoras

- 5 Las células hospedadoras se transfectan o transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de PR087299 y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Un experto en la materia puede seleccionar sin excesiva experimentación las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden hallar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

15 Los métodos para la transfección de células eucarióticas y la transformación de células procariotas son conocidos para el experto con la experiencia habitual, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para tales células. Se utilizan en general para procariotas el tratamiento por calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, o la electroporación. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación por fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). En la patente de Estados Unidos N.º 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de hospedadores de células de mamífero. Las transformaciones en levadura normalmente se llevan a cabo 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 pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

- 30 Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de ADN en los vectores del presente documento incluyen células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *E. coli*. Están disponibles de forma pública diversas cepas de *E. coli*, tal como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen *Enterobacteriaceae* tal 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, *B. licheniformis* 41P divulgada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril del 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos antes que limitativos. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferente debido a que es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinantes. Preferentemente, la célula hospedadora secreta mínimas cantidades de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el hospedador, incluyendo los ejemplos de tales hospedadores *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección de *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tenga la proteasa periplásmica mutante divulgada en la patente de Estados Unidos N.º 4.946.783 expedida el 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasas de ácidos nucleicos.

Además, de los hospedadores procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores de clonación y expresión adecuados para los vectores que codifican PRO87299. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior utilizado de forma común. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290:140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores *Kluyveromyces* (patente de Estados Unidos N.º 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (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 reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales 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 *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]). Son adecuadas en el presente documento las levaduras metilotrópicas e incluyen, pero sin limitación, levaduras que tienen la capacidad de crecer en metanol seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Se puede encontrar un listado de especies específicas que son ilustrativas de esta clase de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de PRO87299 glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humana (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de 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 mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de las células hospedadoras apropiadas se considera dentro de las habilidades en la técnica.

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 la clonación (amplificación de ADN) o para la expresión. Están disponibles de forma pública diversos vectores. El vector puede, por ejemplo, estar en la forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio (o sitios) de endonucleasas de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector en general incluyen, pero sin limitación, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que son conocidas para el experto en la materia.

El PRO87299 se puede producir de forma recombinante no solo de forma directa, 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 N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica PRO87299 que está inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o los líderes de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levadura la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de la invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la patente de Estados Unidos N.º 5.010.182) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la secuencia señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden utilizarse para dirigir la secreción de la proteína secuencias señal de mamífero, tal como secuencias señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como secuencias líder secretorias víricas.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero

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

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

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor ligado operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO87299 para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien los promotores que reconocen diversas células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariontes incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y la lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978);

5 Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); documento EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica PRO87299.

10 Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su 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 glucolíticas [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosa fosfato

15 isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada mediante las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneina,

20 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en expresión en levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

La transcripción de PRO87299 a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como el poliovirus, el virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus del simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles

30 con los sistemas de células hospedadoras.

La transcripción por parte de eucariotas superiores de un ADN que codifica PRO87299 puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, habitualmente aproximadamente desde 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción.

35 Se conocen muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un potenciador procedente de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición

40 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO87299, pero preferentemente se emplaza en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones 5' y, en ocasiones, 3' no traducidas de los ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica PRO87299.

45

50 En Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); el documento EP 117.060 y el documento EP 117.058, se describen todavía otros métodos, vectores y células hospedadoras adecuados para la adaptación para la síntesis de PRO87299 en cultivo celular de vertebrados recombinante.

4. Detección de la amplificación/expresión de genes

55

La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra de forma directa, por ejemplo, mediante transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada de forma apropiada, a base de las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que puedan 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 pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo donde el dúplex esté unido a una superficie, de forma que tras la formación del dúplex sobre la superficie se pueda detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

60

65 La expresión de genes, como alternativa, puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o de cortes de tejido, y un ensayo de cultivo celular o de fluidos corporales, para

cuantificar de forma directa la expresión de los productos génicos. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra, pueden ser ya sea monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse frente a un polipéptido PRO87299 de secuencia nativa o frente a un péptido sintético a base de las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o frente a la secuencia exógena fusionada al ADN de PRO87299 y que codifican un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación del polipéptido

Las formas de PRO87299 se pueden recuperar a partir del medio de cultivo o a partir de lisados de células hospedadoras. Si están unidas a la membrana, pueden liberarse a partir de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Tritón-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del PRO87299 pueden romperse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como someténdolas a ciclos de congelación-descongelación, tratamiento por ultrasonido, ruptura mecánica o agentes que lisan células.

Puede desearse purificar PRO87299 a partir de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación por etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación por sulfato de amonio; utilizando filtración en gel por ejemplo, en Sephadex G-75; columnas de proteína A sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG y columnas quelantes de metal para unir formas etiquetadas con epítipo del PRO87299. Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas y tales métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa (o etapas) de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el PRO87299 particular producido.

E. Distribución tisular

El emplazamiento de tejidos que expresan el PRO87299 se puede identificar determinando la expresión de ARNm en diversos tejidos humanos. La localización de tales genes proporciona información acerca de qué tejidos es más probable que estén afectados por las actividades de estimulación e inhibición de los polipéptidos PRO87299. El emplazamiento de un gen en un tejido específico también proporciona un tejido de muestra para los ensayos de bloqueo de la actividad discutidos a continuación.

Como se indicó anteriormente, la expresión de genes en diversos tejidos se puede medir mediante transferencia de Southern, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 [1980]), transferencia puntual (análisis de ADN) o hibridación *in situ* convencionales, utilizando una sonda marcada de forma apropiada, a base de las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

Como alternativa, se puede medir la expresión de genes en diversos tejidos mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido y ensayo de cultivo celular o de fluidos corporales, para cuantificar de forma directa la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser ya sea monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse frente a una secuencia nativa de un polipéptido PRO87299 o frente a un péptido sintético a base de las secuencias de ADN que codifican el polipéptido PRO87299 o frente a una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica a un polipéptido PRO87299 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico. Las técnicas generales para la generación de anticuerpos y los protocolos especiales para la transferencia de Northern y la hibridación *in situ* se proporcionan a continuación.

F. Estudios de unión de anticuerpo

La actividad de los polipéptidos PRO87299 se puede verificar adicionalmente mediante estudios de unión de anticuerpos, en los que se analiza la capacidad de los anticuerpos anti PRO87299 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO87299, respectivamente, en células de tejido. Los anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describirá a continuación en el presente documento.

Los estudios de unión de anticuerpos se pueden llevar a cabo por cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba por la unión con una limitada cantidad de anticuerpo. La cantidad de la proteína diana en la

muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad del patrón que se une, preferentemente los anticuerpos se insolubilizan antes o tras la competición, de forma que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos pueden separarse de forma conveniente del patrón y el analito que no continúan unidos.

5 Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica distinta, o epitopo, de la proteína a detectar. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de muestra de prueba se une mediante un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y después de eso se une al analito un segundo anticuerpo, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, por ejemplo, la
10 patente de Estados Unidos n.º 4.376.110. El propio segundo anticuerpo puede estar marcado con un residuo detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti inmunoglobulina que esté marcado con un residuo detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el residuo detectable es una enzima.

15 Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser reciente o congelada, o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante tal como formalina, por ejemplo.

G. Ensayos basados en células

20 Los ensayos basados en células y los modelos animales para las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario se pueden utilizar para comprender adicionalmente la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en el presente documento, y el desarrollo y patogenia de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario.

25 En una estrategia distinta, las células de un tipo que se sabe que están implicadas en una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario particular se transfectan con los ADNc descritos en el presente documento, y se analiza la capacidad de estos ADNc para estimular o inhibir la función inmunitaria. Las células adecuadas se pueden transfectar con el gen deseado, y controlar para la actividad de la función inmunitaria. Tales líneas celulares transfectadas pueden después utilizarse para probar la capacidad de los anticuerpos poli o monoclonales o las
30 composiciones de anticuerpo para inhibir o estimular la función inmunitaria, por ejemplo para modular la proliferación de linfocitos T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en el presente documento puede adicionalmente utilizarse para identificar fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario.

35 Además, en los ensayos basados en células en el presente documento se pueden utilizar cultivos primarios obtenidos de animales transgénicos (como se describe a continuación), aunque son preferentes las líneas celulares estables. Las técnicas para obtener líneas celulares continuas procedentes a partir de animales transgénicos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Small *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5:642-648 [1985]).

40 Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mixta (RLM). *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 ensaya la capacidad de un compuesto de prueba para estimular o inhibir la proliferación de linfocitos T activados. Se cultiva con células estimuladoras alogénicas una suspensión de linfocitos T respondedores y se mide la proliferación de linfocitos T por la captación de timidina
45 tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de linfocitos T. Dado que la mayoría de los linfocitos T responde a y produce IL-2 tras la activación, las diferencias en la respuesta en este ensayo en parte reflejan las diferencias en la producción de IL-2 por parte de las células respondedoras. Los resultados de la RLM se pueden verificar mediante un ensayo de detección de linfocinas (IL-2) convencional. *Current Protocols in Immunology*, citado anteriormente, 3.15, 6.3.

50 Una respuesta proliferativa de linfocitos T en un ensayo de RLM puede deberse a las propiedades mitogénicas directas de una molécula ensayada o a la activación inducida por antígeno externo. La activación de linfocitos T necesita una señal antigénica específica mediada a través del receptor de linfocitos T (TCR) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión al ligando, por ejemplo, la interacción de
55 unión B7 (CD80, CD86)/CD28. El entrecruzamiento de CD28 aumenta la secreción de linfocinas por parte de los linfocitos T activados. La activación de linfocitos T tiene controles negativos y positivos a través de la unión de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glucoproteínas relacionadas en la superfamilia de las Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 tiene un efecto de coestimulación de la activación de linfocitos T positivo; de forma inversa, la unión de CTLA-4 a B7 tiene un efecto de desactivación de 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 PR087299 se ensayan para la actividad coestimuladora o inhibidora de los linfocitos T.

65 El uso directo de un compuesto estimulador, como en la invención, se ha validado en experimentos con glucoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando

(4-1BBL) que se expresa en linfocitos T estimulados y señala la activación y crecimiento de linfocitos T. Alderson, M. E. *et al.*, J. Immunol. (1994) 24:2219.

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

10 Como alternativa, un efecto de estimulación o potenciación del sistema inmunitario también puede conseguirse por la administración de un PRO87299 que tenga propiedades de potenciación de la permeabilidad vascular. La permeabilidad vascular potenciada sería beneficiosa para trastornos que pueden atenuarse mediante la infiltración local de células inmunitarias (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, los PMN) y por la inflamación.

15 Por otro lado, los polipéptidos PRO87299, así como otros compuestos de la invención, que son inhibidores directos de la proliferación/activación de linfocitos T, la secreción de linfocinas y/o la permeabilidad vascular, pueden utilizarse de forma directa para suprimir la respuesta inmunitaria. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de la respuesta inmunitaria y para tratar enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmunitaria. Este uso de los compuestos de la invención se ha validado mediante los experimentos descritos anteriormente en que la unión de CTLA-4 al receptor B7 desactiva los
20 linfocitos T. Los compuestos inhibidores directos de la invención funcionan de una manera análoga. Se esperaría que el uso de compuestos que suprimen la permeabilidad vascular reduzca la inflamación. Tales usos serían beneficiosos en el tratamiento de afecciones asociadas a la inflamación excesiva.

25 Como alternativa, los compuestos, por ejemplo anticuerpos, que se unen a polipéptidos PRO87299 estimuladores y que bloquean el efecto estimulador de estas moléculas, producen un efecto inhibitorio neto y pueden utilizarse para suprimir la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T mediante la inhibición de la proliferación/activación de linfocitos T y/o la secreción de linfocinas. El bloqueo del efecto estimulador de los polipéptidos suprime la respuesta inmunitaria del mamífero. Este uso se ha validado en experimentos que utilizan un anticuerpo anti IL2. En estos experimentos, el anticuerpo se une a IL2 y bloquea la unión de IL2 a su receptor, consiguiendo de este modo un
30 efecto inhibitorio de los linfocitos T.

H. Modelos animales

35 Los resultados de los ensayos basados en células *in vitro* se pueden verificar adicionalmente utilizando modelos animales *in vivo* y ensayos para la función de los linfocitos T. Se pueden utilizar diversos modelos animales bien conocidos para comprender adicionalmente el papel de los genes identificados en el presente documento, en el desarrollo y la patogenia de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, y para probar 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
40 respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario incluyen tanto a animales no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Los modelos de animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Tales modelos se pueden generar introduciendo células en ratones singénicos utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implante en el bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la capsula renal, etc.

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

55 Un modelo animal para el rechazo de aloinjerto de piel es un medio para analizar la capacidad de los linfocitos T para mediar la destrucción de tejido *in vivo* y una medida de su papel en el rechazo de trasplantes. Los modelos más comunes y aceptados utilizan injertos de la piel de la cola murinos. Experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de los aloinjertos de piel está mediado por linfocitos T, linfocitos T auxiliares y linfocitos T citolíticos efectores, y no por los anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2ª ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Se describe en detalle un procedimiento adecuado en *Current Protocols in Immunology*, citado más arriba, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplantes que se pueden utilizar para
60 probar los compuestos de la invención son los modelos de trasplante de corazón alogénicos descritos por Tanabe, M. *et al.*, Transplantation (1994) 58:23 y Tinubu, S. A. *et al.*, J. Immunol. (1994) 4330-4338.

65 Los modelos animales para la hipersensibilidad de tipo retardada proporcionan también un ensayo de la función inmunitaria mediada por células. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada son una respuesta inmunitaria *in vivo* mediada por linfocitos T caracterizada por inflamación que no alcanza un pico hasta que ha transcurrido un periodo de tiempo tras la exposición a un antígeno. Estas reacciones también se producen en las

enfermedades autoinmunitarias específicas de tejido tales como la esclerosis múltiple (EM) y la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE, un modelo para EM). Un procedimiento adecuado es el descrito en detalle en *Current Protocols in Immunology*, citado más arriba, unidad 4.5.

5 La EAE es una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T caracterizada por la inflamación por linfocitos T y células mononucleares y la posterior desmielinización de axones en el sistema nervioso central. En general se considera que la EAE que es un modelo animal importante para la EM en seres humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143. Se han desarrollado modelos tanto agudos como recidivantes-remitentes. Los compuestos de la invención se pueden analizar para la actividad estimuladora o inhibidora de linfocitos T frente a la enfermedad desmielinizante mediada por el sistema inmunitario, utilizando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology*, citado más arriba, unidades 15.1 y 15.2. Véanse también los modelos para las enfermedades de la mielina en los que se injertan oligodendrocitos o células de Schwann en el sistema nervioso central como se describe en Duncan, I. D. *et al*, *Molec. Med. Today* (1997) 554-561.

15 La hipersensibilidad de contacto es un ensayo *in vivo* de hipersensibilidad de tipo retardado simple para la función inmunitaria mediada por células. En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos, lo que da lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada que se mide y cuantifica. La sensibilidad por contacto implica una fase de sensibilización inicial seguida de una fase de inducción. La fase de inducción se produce cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que hayan tenido contacto previo. Se produce hinchazón e inflamación, haciendo a este un modelo excelente de dermatitis de contacto alérgica humana. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Coligan, 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).

25 Un modelo animal para la artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmunitaria humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmunitaria humana. Los modelos en ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartilago y del hueso subcondral. Se puede analizar la actividad de los compuestos de la invención frente a la artritis autoinmunitaria utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*, citado más arriba, unidad 15.5. Véase también el modelo que utiliza un anticuerpo monoclonal para CD18 y las integrinas VLA-4, descrito en Issekutz, A.C. *et al.*, *Immunology*, (1996) 88:569.

35 Se ha descrito un modelo de asma en el que se inducen mediante la sensibilización de un animal con ovoalbúmina la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, la eosinofilia pulmonar y la inflamación, y después se expone al animal con la misma proteína entregada mediante aerosol. Varios modelos animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópico en humanos tras la exposición a antígenos en aerosol. Los modelos murinos tienen muchas de las características del asma humano. Los procedimientos adecuados para probar la actividad y la eficacia de los compuestos de la invención 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 citadas allí.

40 De forma adicional, los compuestos de la invención se pueden probar en modelos animales para las enfermedades similares a la psoriasis. La evidencia sugiere para la psoriasis una patogenia de linfocitos T. Los compuestos de la invención se pueden probar 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 de la piel histopatológicas que se asemejan a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/scid de ratón preparada como se describen en Nickoloff, B. J. *et al*, *Am. J. Path.* (1995) 146:580.

50 Los modelos de animales recombinantes (transgénicos) se pueden diseñar introduciendo la porción codificante de los genes identificados en el presente documento en el genoma de los animales de interés, utilizando técnicas convencionales para producir animales transgénicos. Los animales que pueden servir como una diana para la manipulación transgénica incluyen, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Las técnicas conocidas en la técnica para introducir un transgén en tales animales incluyen microinyección pronuclear (Hoppe y Wanger, patente de Estados Unidos n.º 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); direccionamiento de genes en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cel. Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitano *et al.*, *Cell* 57, 717-73 [1989]). Para una revisión véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.736.866.

60 Para el fin de la presente invención, los animales transgénicos incluyen los que portan el transgén solo en parte de sus células ("animales en mosaico"). El transgén puede integrarse como un transgén único, o en concatémeros, por ejemplo, tándems cabeza frente a cabeza o cabeza frente a cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula particular es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6232-636 (1992).

65 La expresión del transgén en animales transgénicos se puede controlar mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede utilizar para verificar la integración del transgén el análisis por transferencia de Southern o la

amplificación por PCR. Después, se puede analizar el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis por transferencia de Northern, PCR o inmunohistoquímica.

Adicionalmente, pueden examinarse los animales para signos de patología inmunitaria, por ejemplo mediante examen histológico para determinar la infiltración de las células inmunitarias en tejidos específicos. Además se pueden realizar experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos se tratan con los compuestos de la invención para determinar la extensión de la estimulación o la inhibición de la proliferación de linfocitos T de los compuestos. En estos experimentos, los anticuerpos bloqueantes que se unen al polipéptido PR087299, se preparan como se describió anteriormente, se administran al animal y se determina el efecto sobre la función inmunitaria.

Como alternativa, se pueden construir animales "genosuprimidos" que tengan un gen defectuoso o modificado 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 modificado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, en conformidad con técnicas establecidas se puede utilizar ADNc que codifica un polipéptido particular para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido. Una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular se puede delecionar o reemplazar por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que puede utilizarse para controlar la integración. Normalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no modificado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [véase por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores para recombinación homóloga]. 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 recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. Después, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una 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), pág. 113-152]. Después, puede implantarse un embrión quimérico en un animal adoptivo hembra pseudopreñado adecuado y el embrión se lleva a término para crear un animal "genosuprimido". La progenie que porta el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas convencionales y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales genosuprimidos se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a determinadas condiciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

I. Terapia inmunoadyuvante

En una realización, los compuestos inmunoestimuladores de la invención se pueden utilizar en terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores (cáncer). Ahora está bien establecido que los linfocitos T reconocen antígenos específicos tumorales humanos. Un grupo de antígenos tumorales, codificados por las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE, son silenciosos en todos los tejidos normales del adulto, pero se expresan en cantidades significativas en los 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 demostrado 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 estimuladores de la invención pueden administrarse como adyuvantes, solos o junto con un agente regulador del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterápico, para estimular la proliferación/activación de linfocitos T y una respuesta antitumoral contra antígenos tumorales. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterápico puede administrarse en cantidades convencionales utilizando regímenes de administración conocidos. La actividad inmunoestimuladora por parte de los compuestos de la invención permite usar cantidades reducidas de los agentes de regulación del crecimiento, citotóxicos o quimioterápicos, reduciendo de este modo, de forma potencial, la toxicidad para el paciente.

J. Ensayos de cribado para candidatos a fármacos

Los ensayos de cribado para los candidatos a fármaco se diseñan para identificar compuestos que se unen a o forman complejo con los polipéptidos que codifican los genes identificados en el presente documento, o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o interfieren de otra forma con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Tales ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de candidatos a fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos antiidiotipo, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos. Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica. Todos los ensayos tienen en común que llamar al contacto del candidato a fármaco con un polipéptido que codifica

un ácido nucleico identificado en el presente documento, en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que estos dos componentes interactúen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, se inmoviliza sobre una fase sólida el polipéptido que codifica el gen identificado en el presente documento o el candidato a fármaco, por ejemplo sobre una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. El acoplamiento no covalente en general se logra mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y el secado. Como alternativa, se puede utilizar para anclarlo a una superficie sólida un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a inmovilizar. Este ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se acaba, los componentes que no reaccionaron se eliminan, por ejemplo mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente no inmovilizado originalmente porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se produjo la formación de complejo. Cuando el componente no inmovilizado originalmente no porta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une de forma específica al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa con pero no se une a una proteína particular que codifique un gen identificado en el presente documento, su interacción con esa proteína se puede evaluar mediante métodos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como entrecruzamiento, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o de columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden controlar utilizando un sistema genético basado en levaduras 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 divulga en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, constan de dos dominios modulares físicamente discretos, uno actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (en general denominado como el "sistema de doble híbrido") toma ventaja de esta propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4 y otra en la que las proteínas activadoras candidatas están fusionadas al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato para β -galactosidasa cromogénico. Está disponible de forma comercial un kit completo (MATCHMAKER™) de Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas, utilizando la técnica de doble híbrido. Este sistema también puede extenderse al mapeo de dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas, así como a la determinación precisa de los restos de aminoácido que son cruciales 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 analizar, habitualmente 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 permitan la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión, la reacción se desarrolla en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción para servir como un control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla como se describe 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 prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

K. Composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario

Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario incluyen, pero sin limitación, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y de ribozima, moléculas de triple hélice, etc. que inhiben o estimulan la función inmunitaria, por ejemplo, la proliferación/activación de linfocitos T, la liberación de linfocinas o la infiltración de células inmunitarias.

Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido y de ARN actúan para bloquear de forma directa la traducción de ARNm hibridando con el ARNm que se tiene como objetivo y evitando la traducción de proteínas. Cuando se utiliza ADN antisentido, son preferentes los oligodesoxirribonucleótidos obtenidos del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que tienen la capacidad de catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión para ribozimas específicos dentro de una diana de ARN potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para detalles adicionales véase, por ejemplo,

Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994), y la publicación PCT n.º WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

5 Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser monocatenarias y constar de deoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de forma que promueva la formación de la triple hélice a través de las reglas del emparejamiento de bases de Hoogsteen, que en general necesita tramos dimensionables de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 97/33551, citado anteriormente.

10 Estas moléculas se pueden identificar mediante cualquiera o cualquier combinación de los ensayos de cribado discutidos anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida para los expertos en la materia.

15 L. Anticuerpos anti PRO87299

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos anti PR087299. Los anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

20 1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti PR087299 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden generar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, de un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PR087299 o una proteína de fusión del mismo. Podría ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen pero sin limitación la hemocianina de lapa californiana, la seroalbúmina, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de la tripsina de la soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). Un experto en la materia puede seleccionar el protocolo de inmunización sin experimentación excesiva.

25 2. Anticuerpos monoclonales

35 Los anticuerpos anti PRO87299 pueden, como alternativa, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos del hibridoma, tales como los descritos en Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Normalmente, en un método del hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza con un agente inmunizante para generar linfocitos que producen o que tienen la capacidad de producir anticuerpos que se unirán de forma específica al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante normalmente incluirá el polipéptido PR087299 o una proteína de fusión del mismo. En general, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("los PBL") si se desean células de origen humano, o se utilizan células esplénicas o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Después, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Habitualmente, las líneas celulares inmortalizadas son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de roedor, bovino o ser humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

55 Las líneas celulares inmortalizadas preferentes son las que se fusionan de forma eficaz, sustentan una expresión del anticuerpo estable, de alto nivel, por parte de las células que producen anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferentes son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. También se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63].

65 Después, puede ensayarse la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a PR087299 en el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos

monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

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

Los anticuerpos monoclonales que secretan los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Además, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinantes, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótido que tengan la capacidad de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los que después se transfieren en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina de otra forma, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Además, el ADN puede modificarse por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, citado anteriormente] o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es una inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es una inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación con el antígeno de un anticuerpo de la invención, para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y de la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. En general, la cadena pesada está truncada en cualquier punto de la región Fc, de forma que se impide el entrecruzamiento de la cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína importantes se sustituyen por otro resto de aminoácido o se delecionan de forma que se impide el entrecruzamiento.

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

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti PR087299 de la invención pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos quiméricos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencias mínimas obtenidas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos procedentes de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplaza por restos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por 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 la CDR o de la región marco conservada importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR correspondientes a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana.

Estos restos de aminoácido no humanos con frecuencia se denominan como restos "importados, los cuales normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR de roedor o las secuencias de CDR para 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 sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos del FR se sustituyen por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Además, los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* (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)]. De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse introduciendo los locus de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado de forma parcial o completa. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, la cual asemeja de forma estrecha en todos los aspectos la observada en humanos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblado y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 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).

Además, los anticuerpos pueden madurarse por afinidad utilizando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos como se describe anteriormente. Los anticuerpos madurados por afinidad preferentes tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 o 30 veces mayor que el anticuerpo inicial (en general murino, humanizado o humano) a partir del que el anticuerpo maduro se prepara.

4. Anticuerpos biespecíficos

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

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos es a base de la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen distintas especificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Debido a la distribución al azar de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo distintas, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta habitualmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad. En el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se divulgan procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es 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 la 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 contransfectan en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otra estrategia descrita en el documento WO 96/27011, la interfaz entre una pareja de moléculas de anticuerpo se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo de células recombinantes. La interfaz 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 aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por unas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina) se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena (o cadenas) lateral grande en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo. Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando ligamiento químico. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) describe un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden de forma proteolítica para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente acomplejante de ditiol arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuros intermoleculares. Después, los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después, uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte al Fab' -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse de forma directa a partir de *E. coli* y acoplarse de forma química para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describe la producción de una molécula de anticuerpo $F(ab')_2$ biespecífico humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó de forma separada a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado tenía la capacidad de unirse a células con expresión aumentada del receptor ErbB2 y a linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a las dianas de tumor de mama humano.

Además se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos de forma directa a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos distintos mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Además, este método puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio de variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión al antígeno. También se han informado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros F_v monocatenarios (sF_v). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítomos distintos sobre un dado polipéptido PR087299 en el presente documento. Como alternativa, un brazo del polipéptido anti PR087299 se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocito T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG ($Fc\gamma R$), tales como $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) y $Fc\gamma RIII$ (CD16), de modo que se pone la mira en los mecanismos de defensa celulares contra la célula que expresa el polipéptido PR087299 particular. Además, los anticuerpos biespecíficos pueden utilizarse para emplazar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido PR087299 particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a PR087299 y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PR087299 y se une adicionalmente al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del ámbito de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados constan de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario hacia células no deseadas [Patente de Estados Unidos N.º 4.676.980] y para el tratamiento de infecciones por VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *ni vitro* utilizando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los divulgados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 4.676.980.

6. Diseño de la función efectora

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, de modo que se potencie, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se puede introducir un resto (o restos) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentadas. Véase, Caron *et al.*, J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse utilizando entrelazadores heterobifuncionales, como se describe en Wolff *et al.* Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales, y de este modo puede tener capacidades de lisis por complemento y de ADCC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

7. Inmunoconjugados

La invención también concierne a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterápico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, cadena A de la exotoxina (procedente de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, cursina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Hay disponibles diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Los conjugados de anticuerpo y de agente citotóxico se preparan utilizando diversos agentes acoplantes de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehidos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisociantao) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede estar conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento tumoral, en el que se administra al paciente el conjugado de anticuerpo-receptor, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido utilizando un agente clarificante y después administrando un "ligando" (por ejemplo, avidina) que esté conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

8. Inmunoliposomas

Los anticuerpos divulgados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); y las patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se divulgan en la patente de Estados Unidos N.º 5.013.556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar mediante 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 extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a 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. De forma opcional, está contenido dentro del liposoma un agente quimioterápico (tal como doxorubicina). Véase, Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989).

M. Composiciones farmacéuticas

Se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario las moléculas PRO87299 activas (por ejemplo, los polipéptidos PRO87299, los anticuerpos anti PRO87299 y/o las variantes de

cada uno), así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado divulgados anteriormente, en la forma de composiciones farmacéuticas.

5 Las formulaciones terapéuticas de la molécula PRO87299 activa, preferentemente un polipéptido o anticuerpo de la invención, se preparan para el almacenamiento mezclando la molécula activa que tiene el grado de pureza deseado, con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen 10 ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; 15 polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteínas) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

20 Los compuestos identificados mediante los ensayos de cribado divulgados en el presente documento se pueden formular de una manera análoga, utilizando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica.

También se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para entregar la molécula PRO87299 a la célula. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, es preferente el fragmento inhibidor más pequeño que se una de forma específica al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas de péptido que retienen la capacidad de unirse a secuencias de la proteína diana, basadas en las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo. Tales péptidos se pueden sintetizar de forma química y/o producir mediante tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993]).

30 La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Como alternativa, o en adición, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación, en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

35 Las moléculas PRO87299 activas también pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de entrega de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

45 Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida de las moléculas PRO87299. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, 50 poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etilen-vinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros tales como el acetato de etilvinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse 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 prever estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S 60 intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

N. Métodos del tratamiento

65 Se contempla que los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos activos se puedan utilizar para tratar diversas

enfermedades y afecciones relacionadas con el sistema inmunitario, tales como enfermedades medidas por linfocitos T, incluyendo las caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, la estimulación de la proliferación de linfocitos T, la inhibición de la proliferación de linfocitos T y el aumento o disminución de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

5 Las afecciones y los trastornos a modo de ejemplo a tratar con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la invención, incluyen, pero sin limitación, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la artritis juvenil crónica, la osteoartritis, las espondiloartropatías, la esclerosis sistémica (esclerodermia), las miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna paroxística), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmunomediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica) diabetes mellitus, enfermedad renal inmunomediada (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 autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible a gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunitarias o inmunomediadas que incluyen enfermedades de la piel vesiculares, 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 de hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante que incluyen el rechazo de injerto y la enfermedad del injerto contra el hospedador.

25 En el lupus eritematoso sistémico, el medidor central de la enfermedad es la producción de anticuerpos autoreactivos contra las proteínas/tejidos propios y la posterior generación de inflamación inmunomediada. Los anticuerpos median la lesión tisular de forma ya sea directa o indirecta. Aunque no se ha demostrado que los linfocitos T estén implicados de forma directa en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos autoreactivos. La génesis de la enfermedad por lo tanto es dependiente de linfocitos T. Están afectados
30 clínicamente múltiples órganos y sistemas, incluyendo riñón, pulmón, aparato locomotor, mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y la sangre.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria sistémica crónica, que implica principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones con la lesión resultante para el cartílago articular.
35 La patogénesis es dependiente de linfocitos T y está asociada a la producción de factores reumatoides, autoanticuerpos dirigidos frente a IgG propias, con la formación resultante de complejos inmunitarios que alcanzan altos niveles en el líquido sinovial y en la sangre. Estos complejos pueden inducir en la articulación la marcada infiltración de linfocitos y monocitos en la membrana sinovial y los posteriores marcados cambios sinoviales; si células similares, con la adición de numerosos neutrófilos, infiltran el espacio/líquido articular. Los tejidos afectados
40 son principalmente articulaciones, a menudo con un patrón simétrico. Sin embargo, también se produce enfermedad extraarticular en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extraarticulares con enfermedad articular progresiva en curso y lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extraarticular es el así llamado síndrome de Felty, que se produce de forma tardía en el transcurso de la AR, en ocasiones después de que la enfermedad articular se ha hecho latente, e implica la presencia de
45 neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede estar acompañado de vasculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Además, los pacientes a menudo desarrollan nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo que cubren las articulaciones afectadas, los nódulos de la fase terminal tienen centros necróticos rodeados de un infiltrado de células inflamatorias mixto. Otras manifestaciones que pueden producirse en la AR incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar,
50 queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que a menudo comienza antes de los 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la AR; algunos pacientes que son positivos con el factor reumatoide se clasifican como que padecen dermatitis reumatoide juvenil. Esta enfermedad se subclasifica en tres
55 categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y normalmente es destructiva y conduce a la anquilosis articular y al retardo del crecimiento. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto del gen HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal, espondilitis asociada a psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características distintivas incluyen sacroileitis con y sin espondilitis; artritis asimétrica inflamatoria; asociación con HLA-B27 (un alelo definido de forma serológica del locus HLA-B del MHC de clase I); inflamación ocular y ausencia de autoanticuerpos asociada a otras
60 enfermedades reumatoides. Las células más implicadas como claves para la inducción de la enfermedad son los linfocitos T CD8+, una célula que se dirige a antígenos presentados mediante las moléculas del MHC de clase I. Los
65

linfocitos T CD8+ pueden reaccionar frente al MHC de clase I alelo HLA-B27, como si este fuese un péptido extraño expresado por las moléculas del MHC de clase I. Se ha hipotetizado que un epítipo del HLA-B27 puede mimetizar un epítipo antigénico bacteriano u otro epítipo antigénico microbiano, e inducir así una respuesta de linfocitos T CD8+.

5 La esclerosis sistémica (esclerodermia) tiene una etiología desconocida. Un distintivo de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente esto se induce mediante un proceso inflamatorio activo. La esclerodermia puede ser localizada o sistémica; son comunes las lesiones vasculares y la lesión celular endotelial en la microvasculatura es un acontecimiento temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por el sistema inmune. Está implicada una base inmunológica mediante la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia en muchos pacientes de anticuerpos antinucleares. En las lesiones de la piel a menudo el ICAM-1 está regulado de forma positiva en la superficie celular de los fibroblastos, sugiriendo que las interacciones de linfocitos T con estas células pueden tener un papel en la patogenia de la enfermedad. Otros órganos implicados incluyen: el tracto gastrointestinal: la atrofia y la fibrosis del músculo liso lo que da como resultado la peristalsis/motilidad anómala; riñón: la proliferación de la íntima subendotelial concéntrica que afecta pequeñas arterias arciformes e interlobulares con la resultante circulación sanguínea córtico-renal reducida da como resultado proteinuria, azoemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de la banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

20 Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyen dermatomiositis, polimiositis y otros son trastornos de inflamación del músculo crónica de etiología desconocida, que da como resultado debilidad muscular. La lesión/inflamación muscular a menudo es simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos están asociados a la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de miositis están dirigidos frente a e inhiben la función de los componentes, las proteínas y los ARN implicados en la síntesis de proteínas.

30 El síndrome de Sjogren se debe a la inflamación inmunomediada y la posterior destrucción funcional de las glándulas lacrimales y las glándulas salivales. La enfermedad se puede asociar a o puede estar acompañada de enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad está asociada a la producción de autoanticuerpos frente a los antígenos Ro y La, 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.

35 Las vasculitis sistémicas son enfermedades en las que la lesión principal es la inflamación y el posterior daño de los vasos sanguíneos, que da como resultado la isquemia/necrosis/degeneración de los tejidos a los que suministran los vasos afectados y la eventual disfunción final de los órganos en algunos casos. Las vasculitis también pueden producirse como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades mediadas por el sistema inmune-inflamatorias tales como la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, etc., en particular enfermedades también asociadas a la formación de complejos inmunitarios. Las enfermedades en el grupo de las vasculitis sistémicas primarias incluyen: vasculitis necrosante sistémica: poliarteritis nodular, angitis alérgica y granulomatosis, poliarteritis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis linfomatoide; y arteritis de células gigantes. Las vasculitis diversas incluyen: síndrome de los ganglios linfáticos mucocutáneo (SNLM o enfermedad de Kawasaki), vasculitis, vasculitis aislada del SNC, enfermedad de Behet, tromboangitis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis cutánea necrosante. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis enumeradas se cree que se debe principalmente a la deposición de complejos de inmunoglobulina en las paredes de los vasos y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria a través ya sea de ADCC, de activación de complemento o ambos.

50 La sarcoidosis es una afección de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido del cuerpo; la implicación del pulmón es la más común. La patogenia implica la persistencia de macrófagos y de células linfoides activados en los sitios de la enfermedad con la posterior secuela crónica que resulta de la liberación de productos activos de forma local y sistémica liberados por estos tipos celulares.

55 La anemia hemolítica autoinmunitaria incluye anemia hemolítica autoinmunitaria, pancitopenia inmunitaria y hemoglobinuria nocturna paroxística son resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otros leucocitos que incluyen también plaquetas) y es un reflejo de la eliminación de las células recubiertas de anticuerpos a través de la lisis mediada por el complemento y/o mecanismos mediados por ADCC/receptor Fc.

60 En la trombocitopenia autoinmunitaria, incluyendo la púrpura trombocitopénica y la trombocitopenia inmunomediada en otros contextos clínicos, se produce la destrucción/eliminación de plaquetas como resultado del acoplamiento de anticuerpos o del complemento a plaquetas, y la posterior eliminación mediante mecanismos de lisis por complemento, ADCC o receptor Fc.

65 Las tiroiditis, incluyendo enfermedad de Grave, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil y tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmunitaria frente a 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 (cepas de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales con ya sea tiroglobulina, antígeno microsómico tiroideo (peroxidasa tiroidea).

5 La diabetes mellitus de tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmunitaria de células β de los islotes pancreáticos; la destrucción está mediada por autoanticuerpos y linfocitos T autoreactivos. Los anticuerpos para la insulina o el receptor de insulina pueden también producir el fenotipo de no respuesta a la insulina.

10 Las enfermedades renales medidas por el sistema inmunitario, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de la lesión mediada por anticuerpos o por linfocitos T del tejido renal de forma ya sea directa como el resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o de linfocitos T frente a antígenos renales o indirecta como resultado de la deposición de complejos de anticuerpos y/o inmunitarios en el riñón que son reactivos frente a otros antígenos no renales. Por lo tanto, otras enfermedades inmunomediadas que dan como resultado la formación de inmunocomplejos también pueden inducir enfermedades renales mediadas por el sistema inmunitario como una secuela indirecta. Los mecanismos inmunitarios directos o indirectos dan como resultado la respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales, con el resultante deterioro de la función de los órganos y en algunos casos la evolución hacia la falla renal. Pueden estar implicados en la patogenia de las lesiones los mecanismos inmunitarios humoral y celular.

20 Las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo esclerosis múltiple; polineuropatía desmielinizantes idiopática o síndrome de Guillain-Barré y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, se cree que tienen una base autoinmunitaria y dan como resultado la desmielinización nerviosa como resultado del daño provocado en los oligodendrocitos o directamente en la mielina. En la EM existen pruebas que sugieren que la inducción y evolución de la enfermedad son dependientes de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de linfocitos T y tiene ya sea un desarrollo recidivante-remite o un desarrollo progresivo crónico. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el entorno y la autoinmunidad, contribuyen todas. Las lesiones contienen infiltrados, mediados predominantemente por linfocitos T, de microglíocitos y macrófagos infiltrantes; los linfocitos T CD4+ son el tipo celular predominante en las lesiones. Se desconocen los mecanismos de la muerte celular de los oligodendrocitos y la posterior desmielinización, pero es probable que estén dirigidos por linfocitos T.

35 La enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, incluyendo las neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad, pueden implicar una respuesta inmunoinflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta sería de beneficio terapéutico.

40 La enfermedad de la piel autoinmunitaria o inmunomediada, incluyendo enfermedades de la piel vesiculares, eritema multiforme y dermatitis de contacto, están mediadas por autoanticuerpos, la génesis de los cuales es dependiente de linfocitos T.

La soriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células procesadoras de antígeno, y algunos neutrófilos.

45 Las enfermedades alérgicas, incluyendo asma; rinitis alérgica; dermatitis atópica; hipersensibilidad alimentaria y urticaria, son dependientes de linfocitos T. Estas enfermedades están medidas de forma predominante por inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

50 Las enfermedades asociadas al trasplante, incluyendo el rechazo de injerto y la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD), son dependientes de linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T produce una mejora.

55 Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria tiene beneficio son las enfermedades infecciosas que incluyen, pero sin limitación, infección viral (incluyendo pero sin limitación el SIDA, las hepatitis A, B, C, D, E y el herpes), infección bacteriana, infecciones fúngicas e infecciones protozoarias y parasitarias (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la RLM, que pueden utilizarse de forma terapéutica para potenciar la respuesta inmunitaria para agentes infecciosos), las enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan el RLM pueden utilizarse de forma terapéutica para potenciar la respuesta inmunitaria para afecciones de inmunodeficiencia heredada, adquirida, inducida infecciosa (como en la infección por VIH), o yatrógenas (es decir, como procedente de la quimioterapia) y la neoplasia.

60 Se ha demostrado que algunos pacientes humanos de cáncer desarrollan una respuesta de anticuerpos y/o de linfocitos T contra antígenos en células neoplásicas. También se ha demostrado en modelos animales de neoplasia que la potenciación de la respuesta inmunitaria puede dar como resultado el rechazo o la regresión de ese neoplasma particular. Las moléculas que potencian la respuesta de linfocitos T en la RLM tienen utilidad *in vivo* en la potenciación de la respuesta inmunitaria frente a la neoplasia. Las moléculas que potencian la respuesta proliferativa de linfocitos T en la RLM (o agonistas de molécula pequeña o anticuerpos que afectan al mismo receptor en un modo agonista) pueden utilizarse de forma terapéutica para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta

de linfocitos en la RLM también funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmunitaria para un neoplasma; tales moléculas pueden expresarse en las mismas células neoplásicas o su expresión puede estar inducida en otras células por el neoplasma. El antagonismo de tales moléculas inhibitorias (ya sea con anticuerpos, antagonistas de molécula pequeña u otros medios) potencia el rechazo del tumor inmunomediado.

De forma adicional, la inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener beneficio terapéutico en la lesión por reperfusión, el ictus, el infarto de miocardio, la aterosclerosis, la lesión pulmonar aguda, el choque hemorrágico, quemaduras, el shock por septicemia/choque septicémico, necrosis tubular aguda, endometriosis, enfermedad articular degenerativa y pancreatitis.

Los compuestos de la presente invención, por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos, se administran a un mamífero, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, mediante las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación (intranasal, intrapulmonar). Es preferente la administración intravenosa o inhalada de los polipéptidos y anticuerpos.

En la terapia inmunoadyuvante, otros regímenes terapéuticos, como la administración de un agente antineoplásico, pueden combinarse con 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 antineoplásico (agente quimioterápico) o terapia de radiación. Los programas de preparación y dosificación para tales agentes quimioterápicos pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como se determine de forma empírica por un facultativo experimentado. Los programas de preparación y dosificación para tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterápico puede preceder, o seguir la administración del inmunoadyuvante o puede proporcionarse de forma simultánea con el mismo. De forma adicional, se puede proporcionar un compuesto antiestrógeno tal como el tamoxifeno o un antiprogesterona tal como la onapristona (véase el documento EP 616812), en dosificaciones conocidas para tales moléculas.

Puede ser conveniente administrar también anticuerpos frente a otros antígenos asociados a enfermedad inmunitaria 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 en adición, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos distintos divulgados en el presente documento. En ocasiones, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización, los polipéptidos PR087299 se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido de un polipéptido PR087299. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración en primer lugar. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las usadas actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido PR087299.

Para el tratamiento o reducción de la gravedad de la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y desarrollo de la enfermedad, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al compuesto, y el criterio del médico responsable. El compuesto se administra de forma adecuada al paciente en una única vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

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

O. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales (por ejemplo, que comprende una molécula PR087299) útil para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase e instrucciones. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los envases pueden estar formados de diversos materiales tales como vidrio o plástico. Los envases contienen una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la afección y pueden tener un orificio de entrada estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Habitualmente el principio activo en la composición es un polipéptido o un anticuerpo de la invención. Una indicación o etiqueta sobre, o asociada al envase, indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o tratamiento de la

afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales convenientes procedentes desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos de envase con indicaciones para el uso.

P. Diagnóstico y pronóstico de la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario

Las proteínas de superficie celular, tales como las proteínas que tienen expresión aumentada en determinadas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, son excelentes dianas para candidatos a fármaco o el tratamiento de enfermedades. Las mismas proteínas junto con proteínas secretadas que codifican los genes amplificadas en las patologías relacionadas con el sistema inmune, encuentran uso adicional en el diagnóstico y en el pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, pueden utilizarse para el diagnóstico o el pronóstico los anticuerpos dirigidos frente a los productos de proteína de genes amplificadas en la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide u otra enfermedad relacionada con el sistema inmunitario.

Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, pueden utilizarse para detectar de forma cualitativa o cuantitativa la expresión de proteínas que codifican genes amplificadas o con expresión aumentada ("productos de genes marcadores"). El anticuerpo preferentemente está dotado de un marcador detectable, por ejemplo, fluorescente, y la unión se puede controlar mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. Estas técnicas son particularmente adecuadas si el gen que con expresión aumentada codifica una proteína de superficie celular. Tales ensayos de unión se realizan esencialmente como se describe anteriormente.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos de genes marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica. Para este fin, se retira del paciente una muestra de estudio histológica y se aplica a ella un anticuerpo marcado, preferentemente recubriendo una muestra biológica con el anticuerpo. Este procedimiento también permite determinar en el tejido examinado la distribución del producto del gen marcador. Será obvio para los expertos en la materia que para la detección *in situ* está disponible con facilidad una amplia diversidad de métodos histológicos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención de ningún modo.

35 Ejemplos

Los reactivos disponibles de forma comercial a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique otra cosa. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos y a lo largo de toda la especificación, por los números de registro de la ATCC, es la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Clonación de PRO87299

Se buscó en una base de datos de ADN de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Merck/Washington University) y se identificó una EST que contenía dominios de interés, concretamente el dominio (o dominios) de inmunoglobulina (Ig) y el motivo (o motivos) de inhibición de la inmutirosina (ITIM). La búsqueda se realizó utilizando el programa de ordenador BLAST o BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] utilizando como comparación los dominios de interés para una traducción de las secuencias de seis fases de lectura abierta. Las comparaciones que dieron como resultado una puntuación de BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o mayor que no codificaban proteínas conocidas se agruparon, y si era necesario se ensamblaron en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Se sintetizaron los oligonucleótidos a base de la secuencia como se describió anteriormente: 1) para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para PRO87299. Los cebadores directo e inverso de PCR en general varían entre 20 a 30 nucleótidos y a menudo se diseñan para proporcionar un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de las sondas normalmente son de 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Para explorar varias bibliotecas para un clon de longitud completa, se exploró ADN de las bibliotecas mediante amplificación por PCR, como en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, citado anteriormente, con el par de cebadores de PCR. Después, se utilizó una biblioteca positiva para aislar clones que codifican el gen de interés, utilizando el oligonucleótido de sonda y una de las parejas de cebadores.

Las sondas de oligonucleótido empleadas fueron como sigue:

Cebador directo: hBTig.EcoRI.F2 5' TTGAATTCATGAAGACATTGCCTGCCATGC 3' (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso: hBTig.BamHI.R2 5' TTGGATCCTTAAGTCTCACACATATGGATGCATATTC 3' (SEQ ID NO: 12)

5 Se utilizó en el clonaje una biblioteca de ADNc de sangre humana. La biblioteca de ADNc utilizada para aislar los clones de ADNc se construyó mediante métodos convencionales utilizando reactivos disponibles de forma comercial tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se preparó con oligo dT que contenía un sitio NotI, unido con extremos romos a los adaptadores hemiquinaseados Sall, escindidos con NotI, dimensionados de forma apropiada mediante electroforesis en gel y clonados 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 SfiI; véase, Holmes *et al.*, Science, 10 253:1278-1280 (1991)) en sitios XhoI y NotI únicos.

La secuencia de nucleótidos entera del clon, denominada en el presente documento como DNA332467, se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El clon DNA332467 contiene una fase de lectura abierta única con un sitio de iniciación de la traducción aparente en las posiciones de nucleótido 24-26 y una señal de detención en las 15 posiciones de nucleótido 891-893 (Figura 1, SEQ ID NO: 1). El precursor de polipéptido predicho es de 289 aminoácidos de longitud, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 32781 daltons y un pI estimado de aproximadamente 6,27. El análisis de la secuencia de PRO87299 de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) evidencia la presencia de diversos dominios del polipéptido importantes, como se muestra en la Figura 2, en la que los emplazamientos proporcionados para los dominios de polipéptido son aproximados como se describe. 20

Un análisis de la base de datos de proteína actual, utilizando el análisis de alineamiento de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), evidenció la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos de PRO87299 y secuencias de proteínas desconocidas. 25

EJEMPLO 2: Clonación de las variantes de PRO87299.

Se exploró PRO87299 para las variantes de secuencia en ARN de linfocitos B de 16 donantes distintos. Se realizó RT-PCR sobre este ARN para producir el PRO87299 de longitud completa. Los productos de PCR se clonaron en 30 vectores que permitían la secuenciación de alto rendimiento y se analizaron mediante secuenciación de doble pase. Varias variantes de PRO87299 mostraron mínima variación (Figura 11A-F). Sin embargo, se encontró una versión truncada que tenía el exón 3 delecionando, lo que deleciona el dominio transmembrana (Figura 7, SEQ ID NO: 7). La versión truncada tiene delecionados los ácidos nucleicos 403-547 de la proteína nativa, dando como resultado un polipéptido PRO87299 variante (Figura 8, SEQ ID NO: 8) que es solo de 241 de longitud, mientras que PRO87299 nativa es de 289 aminoácidos de longitud. Una carencia del dominio transmembrana puede significar que esta variante de PRO87299 es una forma secretada. 35

Se descubrió una variante de PRO87299 adicional, la cual comprende una inserción de pares de bases de 18 nucleótidos en el extremo 5' del exón 3 (Figura 9, SEQ ID NO: 9). Esta inserción de 18 pares de bases codifica para unos 6 aminoácidos adicionales (AFTNIP), y está insertada en el ácido nucleico que codifica PRO87299 en fase de lectura, dando como resultado un polipéptido PRO87299 variante (Figura 10, SEQ ID NO: 10) que es de 295 aminoácidos de longitud. En la Figura 12A-B se muestran tanto la forma corta como la forma AFTNIP, junto con otras variantes. 40

45 El dominio de IgG encontrado en los aminoácidos 51-117 de todo el polipéptido PRO87299 puede ser importante para la función del polipéptido PRO87299.

EJEMPLO 3: Análisis de micromatriz de los linfocitos T estimulados

50 Las micromatrices de ácido nucleico, que a menudo contienen miles de secuencias de genes, son útiles para identificar genes expresados de forma diferencial en tejidos enfermos en comparación con sus contrapartes normales. Utilizando micromatrices de ácido nucleico se transcriben de forma inversa las muestras ARNm de prueba y de control procedentes de las muestras de tejido de prueba y de control, y se marcan para generar sondas de ADNc. Después, las sondas de ADNc se hibridan con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte 55 sólido. Esta matriz se configura de forma que la secuencia y la posición de cada miembro en la matriz son conocidas. Por ejemplo, se puede disponer sobre un soporte sólido una selección de genes que se sabe que se expresan en determinadas patologías. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de la matriz particular indica que la muestra a partir de la que la sonda se obtuvo expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de prueba (en este caso, linfocitos T CD4+ activados) es mayor que la señal de hibridación de una sonda procedente de una muestra de control (en este caso, linfocitos T CD4+ no estimulados), se 60 identifica el gen o genes con expresión aumentada en el tejido de prueba. La implicación de este resultado es que una proteína con expresión aumentada en un tejido de prueba es útil no solo como un marcador de diagnóstico para la presencia de la enfermedad, sino también como una diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

65 La metodología de la hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatrices es bien conocida en la técnica. En un ejemplo, la preparación concreta de ácidos nucleicos para la hibridación y las sondas, portaobjetos y

condiciones de hibridación están todos detallados en la solicitud de patente PCT N.º de serie PCT/US01/10482, expedida el 30 de marzo de 2001 y que se incorpora como referencia en su totalidad en el presente documento.

5 En este experimento, los linfocitos T CD4+ se purificaron a partir de un único donante utilizando el protocolo de RossetteSep™ de Stem Cell Technologies, Vancouver BC, que contiene anticuerpos anti CD8, anti CD16, anti CD19, anti CD36 y anti CD 56 utilizados para producir una población de linfocitos T CD4+ aislados. Los linfocitos T CD4+ aislados se activaron con un anticuerpo anti CD3 (utilizado a concentraciones que no estimulan la proliferación) junto con ya sea anticuerpo ICAM-1 o anti CD28. A las 24 o 72 horas las células se recogieron, el ARN se extrajo y se llevó a cabo un análisis en micromatrices Affimax™ (Affymetrix Inc. Santa Clara, CA).
10 Inmediatamente después de la purificación se recogieron las células no estimuladas (en reposo) y se sometieron al mismo análisis. Se comparan los genes cuya expresión estaba regulada de forma positiva en cualquiera de los dos puntos de tiempo en las células activadas frente a las células en reposo.

15 El resultado de estos experimentos es que los polipéptidos PRO87299 de la presente invención se expresan de forma significativamente aumentada en linfocitos T CD4+ aislados, activados por anti CD3/ICAM-1 y anti CD3/anti CD28 en comparación con linfocitos T CD4+ en reposo aislados. Como se describe anteriormente, estos datos demuestran que los polipéptidos PRO87299 de la presente invención son útiles no solo como marcadores para el diagnóstico para la presencia de uno o más trastornos inmunitarios, sino que también sirven como agentes terapéuticos para el tratamiento de esos trastornos inmunitarios.

20 EJEMPLO 4: PRO87299 en linfoma.

El linfoma es el 6º cáncer más común en los Estados Unidos. En 1990, en los Estados Unidos hubo unos 43.000 nuevos casos estimados de linfoma. El linfoma no Hodgkin explica la mayoría de los casos, con los casos de linfoma de Hodgkin en un distante segundo lugar. La incidencia del linfoma no Hodgkin aumenta de forma progresiva con la edad. Pero, en la enfermedad de Hodgkin, hay una alta incidencia en pacientes de 20-30 años, una meseta entre los 30-35 y otra subida tras los 55 años. Los hombres están en mayor riesgo que las mujeres, tanto para el linfoma de Hodgkin como para el no Hodgkin. La manifestación clínica principal del linfoma maligno es la inflamación de los ganglios linfáticos y los síntomas incluyen fiebre, malestar y pérdida de peso. Los sitios principales comunes del linfoma incluyen los ganglios supraclaviculares, auxiliares, del mediastino, periaórticos, cervicales e inguinales. El linfoma también tiene el potencial de producir metástasis en otros órganos.

35 Thomas Hodgkin describió por primera vez la enfermedad de Hodgkin en 1832. La enfermedad de Hodgkin es una proliferación no restringida de una célula linfoide que se hace más grande, con abundante citoplasma pálido y dos o más núcleos lobulados ovalados que contienen nucléolos grandes. Las células con este aspecto se conocen como células Reed-Sternberg. Las células Reed-Sternberg son importantes para el diagnóstico de la enfermedad de Hodgkin, pero solo su presencia no es suficiente para el diagnóstico. La enfermedad de Hodgkin es distinta del linfoma no Hodgkin en el tipo celular, la histología de los ganglios linfáticos y en la sintomatología, tal como la fiebre. La enfermedad de Hodgkin en general presenta un agrandamiento de un grupo individual de ganglios linfáticos periféricos, y puede implicar a ganglios contiguos, pero no es frecuentemente que sea extraganglional. La causa de la enfermedad de Hodgkin es desconocida, pero la infección por el virus de Epstein Barr y las translocaciones de bcl-2 previas, están asociadas al desarrollo de la enfermedad de Hodgkin.

45 Los linfomas no Hodgkin son neoplasmas del sistema inmunitario que se generan en los ganglios linfáticos, pero se diferencian de la enfermedad de Hodgkin en factores tales como el tipo celular 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 linfomas de linfocitos T y son positivos para los marcadores CD2 y CD3.

50 Se analizó una base de datos patentada que contiene información sobre la expresión de genes (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) en un intento por identificar si el polipéptido PRO87299 (y sus ácidos nucleicos codificantes) están regulados en el linfoma de forma positiva significativamente, en comparación con los tejidos linfáticos normales. De forma específica, el análisis de la base de datos GeneExpress® se realizó utilizando el programa informático disponible a través de Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para su uso con la base de datos GeneExpress®, o con el programa informático patentado creado y desarrollado en Genentech, Inc. para su uso con la base de datos GeneExpress®. El índice de aciertos positivos en el análisis es a base de varios criterios que incluyen, por ejemplo, la especificidad de tejido, la especificidad tumoral y el nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferativos normales. El resultado es que PRO87299 evidencia una alta expresión en linfoma en comparación con otros tumores y tejidos normales.

60 EJEMPLO 5: PRO87299 en la enfermedad inflamatoria intestinal.

En este experimento se utilizó un ensayo de micromatriz para encontrar genes que tengan expresión aumentada en la EII en comparación con el tejido de intestino normal. Se obtuvieron biopsias de pacientes con EII. Para cada paciente de EII se tomaron muestras de tejido enfermo (ya sea con CU o con Crohn) y de intestino sano, de forma que se pudieran comparar mejor los patrones de expresión. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta que

estuvieron listas para el aislamiento de ARN. Las biopsias se homogeneizaron en 600 µl de tampón RLT (+BME) y el ARN se aisló utilizando las minicolumnas Qiagen™ Rneasy (Qiagen) con un tratamiento de ADNasa en la columna siguiendo las directrices de los fabricantes. Después del aislamiento de ARN se cuantificó el ARN utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes) siguiendo las directrices del fabricante y se comprobó la integridad en geles de agarosa. Se marcaron cantidades apropiadas de ARN para el análisis de micromatriz y se procesaron las muestras en la micromatriz de Genentech y las micromatrices de Affymetrics™ patentadas. Se compararon los genes cuya expresión estaba regulada de forma positiva en tejidos de EI1 frente a intestino normal, haciendo coincidir biopsias de intestino normal y de tejido de EI1 procedentes del mismo paciente. Los resultados de este experimento mostraron que se ha identificado que PRO87299 tiene expresión aumentada de forma significativa en muestras de enfermedad de Crohn en comparación con el tejido de intestino normal.

EJEMPLO 6: Expresión de PRO87299 en linfocitos NK.

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son células efectoras del sistema inmunitario innato importantes. Están especializados en efectuar la destrucción de células hospedadoras que hayan sido infectadas por virus, parásitos o que se hayan hecho cancerosas. Fenotípicamente, los linfocitos NK son linfocitos granulares grandes que constituyen ~2 % de la población de linfocitos en circulación. Se identifican comúnmente mediante la expresión en la superficie celular de CD56 y CD16. Maduran en la médula ósea a partir de células precursoras CD34+ que comparten con los linfocitos T. Los linfocitos NK maduros comparten la expresión de CD8, la maquinaria citolítica y algunos KIR con los linfocitos T, pero son distintos de los linfocitos T por la carencia de CD3 y los receptores de linfocitos T. Al igual que los linfocitos T citotóxicos, contienen gránulos llenos de proteína formadora del poro, de citotoxinas, de serina esterasas y de proteoglicanos que median la lisis de las células diana. Tanto los linfocitos T citotóxicos como los linfocitos NK destruyen al contacto mediante la unión a sus dianas y entregando su carga de productos de químicos, que produce agujeros en la membrana de la célula diana. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos NK no necesitan reconocer un antígeno específico antes de iniciar la lisis. Más bien, la activación del linfocito NK puede estar mediada por factores de crecimiento y citocinas (en particular IL-2, IL-12 e IL-15 han demostrado mediar las actividades proliferativa y citotóxica) o por un delicado balance entre las dos clases de receptores de linfocitos NK, una que activa las células y otra que las inhibe. Los receptores similares a Ig citolíticos (los KIR) son receptores de linfocitos NK que transmiten una señal inhibitoria si se encuentran con moléculas del MHC de clase I sobre una superficie celular. Esto es importante para la destrucción tanto de células cancerosas como de células infectadas de forma vírica. Debido a que los virus a menudo suprimen la expresión del MHC clase I en las células que infectan, las células infectadas con virus se vuelven susceptibles a la destrucción por parte de los linfocitos NK. Asimismo, las células cancerosas han reducido la expresión o no expresan el MHC de clase I, y ellas se vuelven también susceptibles a la destrucción por los linfocitos NK. Los receptores de citotoxicidad naturales (los NCR) constituyen una familia de receptores de activación en los linfocitos NK. En algunos sistemas efector-diana, la densidad de superficie de los NCR correlaciona con la actividad citolítica de los linfocitos NK, mientras que en otros sistemas la destrucción necesita la cooperación entre el NCR, otro receptor de activación NKG2D y su polipéptido adaptador DAP10. De forma adicional, la fuerza de las señales puede estar influenciada por el reconocimiento de correceptores tales como 2B4 y NTB-A. Los ligandos para los NCR y NKG2D, las hemoglutatinas y MICA, MICB respectivamente, no se expresan en la mayoría de las células normales, pero están inducidos en la mayoría de las líneas celulares tumorales. La expresión de los ligandos por parte de las células tumorales desencadena una dramática respuesta inmunitaria que da como resultado el rechazo de la célula tumoral. La activación de los linfocitos NK con IL-15 o IL-12 ha mostrado inducir tanto efectos citotóxicos como proliferativos. La molécula de adhesión de unión 2 (JAM2) ha mostrado que se une a los linfocitos NK y se ha formulado la hipótesis que desempeña un papel en la extravasación de linfocitos en los sitios de inflamación.

Por lo tanto, un experimento de micromatrices de ADN que compara la expresión diferencial de genes de estos tres modos de activación frente a linfocitos NK en reposo tiene el potencial de revelar nuevos genes o nuevas asociaciones de genes con la actividad de los linfocitos NK. Podrían desarrollarse para genes específicos diana revelados por estas micromatrices anticuerpos, péptidos o moléculas pequeñas terapéuticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune y cánceres. Pueden aislarse linfocitos NK de sangre periférica a partir de capas leucocitarias, mediante selección negativa utilizando el kit de aislamiento de linfocitos NK con el sistema magnético de clasificación de células MACS™ (Miltenyi Biotec). La pureza de las células se confirmó mediante tinción con PE anti CD56 para análisis de FACS. La pureza de las preparaciones celulares varió del 89 % al 96 %. Cultivo de células: se prepararon cultivos *in vitro* en placas de 6 pocillos a 5 ml de cultivos/pocillo. Medios: RPMI 1640, SFB inactivado por calor al 10 %, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycinina 100 mg/ml, L-glutamina 2 mM y 10-5 beta-mercaptoetanol 5,5 x. Tratamientos experimentales: Tiempo 0 h, células CD56(+) no tratadas. Tiempo 16 h. No tratado, estimulado con IL2 (10 nM), IL15 (10 nM), JAM-IT (10 nM). La activación de los linfocitos NK se controló mediante FACS por la expresión en superficie celular de CD56 y CD69. En esta serie de experimentos se determinó que PRO87299 se expresa en linfocitos NK CD56+, en comparación cuando se comparó con linfocitos NK en reposo normales.

EJEMPLO 7: 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.

Se empleó como una sonda para explorar los ADN homólogos (tales como las variantes de PRO87299 de origen natural) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano, ADN que comprende la secuencia codificante de PRO87299 de longitud completa o madura, como se divulga en el presente documento.

5 La hibridación y lavado de los filtros que contienen cualquiera de las bibliotecas de ADN se realiza bajo las siguientes condiciones de alta rigurosidad. La hibridación de la sonda obtenida de PRO87299 radiomarcada con los filtros se realiza en una solución de formamida al 50 %, SSC 5x, SDS al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardt 2x y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de SSC 0,1x y SDS al 0,1 % a 42 °C.

Después, pueden identificarse los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica PRO87299 de secuencia nativa de longitud completa, utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

15 EJEMPLO 8: Expresión de PRO87299 en *E. coli*

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

20 La secuencia de ADN que codifica PRO87299 se amplifica de forma inicial utilizando cebadores para PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios de enzimas de restricción que correspondan con los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector de expresión adecuado es pBR322 (obtenido de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)), el cual contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Después, las secuencias amplificadas por PCR se ligan en el vector. Preferentemente, el vector incluirá secuencias que codifican para un gen de resistencia a antibiótico, un promotor *trp*, un líder polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, la secuencia polihis y el sitio de escisión de enteroquinasa), la región codificante de PRO87299, el terminador de la transcripción lambda y un gen *argU*.

30 Después, se utiliza la mezcla de ligamiento para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada utilizando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y después se seleccionan las colonias resistentes a antibiótico. El ADN plasmídico se puede aislar y se confirma mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

35 Los clones seleccionados se pueden crecer durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. Posteriormente, el cultivo de una noche puede utilizarse para inocular un cultivo a mayor escala. Después, las células se crecen hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.

40 Tras el cultivo de las células durante varias horas más, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO87299 solubilizada puede después purificarse utilizando una columna quelante de metales en condiciones que permitan la unión estrecha de la proteína.

45 PRO87299 puede expresarse en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO87299 se amplifica de forma inicial utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzima de restricción que correspondan con los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que provean una iniciación de la traducción eficaz y fiable, la purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias amplificadas por PCR, etiquetadas con poli-His después se ligan en un vector de expresión, el cual se utiliza para transformar un hospedador *E. coli* a base de la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). En primer lugar se crecen los transformantes en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O.600 de 3-5. Después, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando (NH₄)₂SO₄ 3,57 g, citrato de sodio·2H₂O 0,71 g, KCl 1,07 g, extracto de levadura Difco 5,36 g, hycase SF de Sheffield 5,36 g en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30 °C con agitación. Se retiran muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE y se centrifuga el grueso del cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y el repliegamiento.

60 Se resuspende un concentrado de *E. coli* procedente de fermentaciones de 0,5 a 1 l (sedimentos de 6-10 g) en 10 volúmenes (p/v) en tampón guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio para hacer 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 la proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificarlo. El extracto clarificado se carga en una

columna quelante de metales de Ni-NTA de Qiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de columna quelante de metales. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, calidad Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se almacenan a 4 °C. La concentración de proteínas se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado a base de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra de forma lenta en tampón de replegamiento preparado recientemente 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 replegamiento se eligen de forma que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se finaliza mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 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 del 2-10 %. La proteína replegada se somete a cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo desde el 10 al 80 %. Se analizan en geles de poliacrilamida con SDS alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 y se agrupan las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. En general, las especies replegadas de forma apropiada de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo dado que estas especies son las más compactas, con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas habitualmente eluyen a concentraciones de acetonitrilo más elevadas. Además de resolver a partir de la forma deseada formas de las proteínas mal plegadas, la etapa de fase inversa también elimina endotoxinas de las muestras.

Las fracciones que contienen al polipéptido PR087299 plegado deseado se agrupan y se elimina el acetonitrilo utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida hacia la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4 % mediante diálisis o mediante filtración en gel, utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación, y se filtran en esterilidad.

Los polipéptidos PRO87299 divulgados en el presente documento se expresan de forma satisfactoria como se describe anteriormente.

EJEMPLO 9: Expresión de PRO87299 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de PRO87299 mediante la expresión recombinante en células de mamífero.

Se emplea como vector de expresión el vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989). De forma opcional, el ADN de PRO87299 se liga en pRK5 con las enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO87299 utilizando métodos de ligamiento tales como los descritos en Sambrook *et al.*, citado 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 la confluencia en placas de cultivo de tejidos en medio tal como DMEM complementado con suero de ternero fetal y de forma opcional componentes nutritivos y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO87299 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen VA RNA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 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 se deposite durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se aspira y se añaden durante 30 segundos 2 ml de glicerol al 20 % en PBS. Después, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio recién preparado y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas tras las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Tras una incubación de 12 horas se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga sobre un gel con SDS al 15 %. El gel procesado se puede secar y exponer a una película durante un periodo seleccionado de tiempo para revelar la presencia de polipéptido PRO87299. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se analiza en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, PRO87299 se puede introducir en células 293 de forma transitoria utilizando el método de sulfato de dextrano descrito en Sompariyac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se crecen hasta una densidad máxima en un matraz rotativo y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO87299. En primer lugar las células se concentran a partir del matraz rotativo mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba con el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejidos y se reintroducen en el matraz rotativo que contiene medio de cultivo de tejidos, insulina bovina 5 µg/ml y transferrina bovina 0,1 µg/ml. Tras aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar células y residuos. Después, la muestra que

contiene PR087299 expresado se puede concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

5 En otra realización se puede expresar PR087299 en células CHO. pRK5-PR087299 se puede transfectar en células CHO utilizando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se describe anteriormente, se pueden incubar los cultivos celulares y se puede reemplazar el medio con medio de cultivo (solo) o con medio que contiene un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Tras determinar la presencia del polipéptido PR087299, el medio de cultivo se puede reemplazar con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio condicionado. El medio que contiene PR087299 expresado puede después concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado.

15 PR087299 etiquetado con epítipo también puede expresarse en células CHO hospedadoras. El PR087299 puede subclonarse del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarlo en fase de lectura con una etiqueta de epítipo seleccionada tal como una etiqueta poli-his en un vector de expresión de baculovirus. Después, el inserto de PR087299 etiquetado con poli-his puede subclonarse en un vector que contiene un promotor/potenciador de SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Para finalizar, las células CHO se pueden transfectar (como se describe anteriormente) con el vector que contiene el promotor/potenciador de SV40. Para verificar la expresión se puede realizar el marcaje como se describe anteriormente. El medio de cultivo que contiene a PR087299 expresado etiquetado con poli-his puede después concentrarse y purificarse mediante cualquier método seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad quelante de Ni²⁺.

25 Además, PR087299 puede expresarse en células CHO y/o células COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

30 La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (immunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo dominios extracelulares) de las respectivas proteínas se fusionan con una secuencia de la región constante de IgG 1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

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

40 Doce microgramos del ADN plasmídico deseado se introducen en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando los reactivos de transfección disponibles de forma comercial Superfect® (Quiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, citado anteriormente. Se congelan aproximadamente 3×10^{-7} células en una ampolla para el crecimiento y la producción adicional como se describe a continuación.

45 Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan colocándolas en un baño de agua y se mezclan mediante agitación vorticial. Los contenidos se pipeteen en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio de selección (PS20 filtrado por 0,2 µm con suero fetal bovino diafiltrado por 0,2 µm al 5 %). Después, las células se alicuotan en un frasco rotativo de 100 ml que contiene 90 ml de medio de selección. Tras 1-2 días, las células se transfieren a un frasco rotativo de 250 ml relleno con 150 ml de medio de cultivo de selección y se incuban a 37 °C. Tras otros 2-3 días, se siembran matraces de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio de las células se intercambia con medio recién preparado mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio de CHO adecuado, puede utilizarse de hecho un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.122.469, expedida el 16 de junio de 1992. Se siembra con $1,2 \times 10^6$ células/ml un frasco rotativo de producción de 3 l. En el día 0 se determina el pH. En el día 1 se toman muestras del frasco rotativo y se comienza el rociado con aire filtrado. En el día 2 se toman muestras del frasco rotativo, se cambia la temperatura hasta los 33 °C, y se incorporan 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, emulsión de calidad médica de Dow Corning 365). Se ajusta el pH a lo largo de toda la producción según sea necesario para mantenerlo a alrededor de 7,2. Tras 10 días, o hasta que caiga la viabilidad por debajo del 70 %, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado se almacena a 4 °C o se carga de forma inmediata en columnas para la purificación.

65 Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El

medio condicionado se bombea en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada 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. Tras la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrado que contiene imidazol 0,25 M. La proteína purificada de forma elevada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene

5 Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4 %, pH 6,8, con una columna de G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacena a -80 °C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir de los medios condicionados como sigue. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se ha equilibrado

10 en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza de forma inmediata recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína purificada de forma elevada para las proteínas etiquetadas con poli-His, se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se describe anteriormente. Se evalúa la homogeneidad mediante geles de poliacrilamida con SDS y mediante

15 secuenciación de los aminoácidos N terminales mediante degradación de Edman.

Muchos de los polipéptidos PRO87299 divulgados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se describe anteriormente.

20 EJEMPLO 10: Expresión de PRO87299 en levadura

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

En primer lugar, se construyen vectores de expresión en levadura para la producción intracelular o la secreción de

25 PRO87299 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO87299 y el promotor se insertan en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO87299. Para la secreción, el ADN que codifica PRO87299 se puede clonar en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de PRO87299 nativo u otro péptido señal de mamífero o, por ejemplo, un alfa factor de levadura o una secuencia señal/líder secretora de la invertasa, y

30 secuencias enlazadoras (si se necesita) para la expresión de PRO87299.

Las células de levadura, tales como la cepa de levadura AB110, después se pueden transformar con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivar en el medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de las levaduras transformadas se pueden analizar mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10 % y separación

35 mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con tinción de azul de Coomassie.

El PRO87299 recombinante se puede aislar y purificar posteriormente mediante la eliminación de las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación, y después concentrando el medio utilizando filtros en cartuchos seleccionados. El concentrado que contiene PRO87299 puede purificarse adicionalmente utilizando

40 resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

Muchos de los polipéptidos PRO87299 divulgados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se describe anteriormente.

45 EJEMPLO 11: Expresión de PRO87299 en células de insecto infectadas con baculovirus

El siguiente método describe la expresión recombinante de PRO87299 en células de insecto infectadas con baculovirus.

La secuencia que codifica PRO87299 se fusiona cadena arriba de una etiqueta de epítipo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Tales etiquetas de epítipo incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (similares a las regiones Fc de la IgG). Se pueden emplear diversos plásmidos, incluyendo plásmidos obtenidos de plásmidos disponibles de forma comercial tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica

50 PRO87299 o la porción deseada de la secuencia codificante 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 mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionadas). Después, se digiere el producto con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

55

El baculovirus recombinante se genera cotransfectando el plásmido anterior y el ADN de virus BaculoGold™ (PharMingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible de forma comercial de GIBCO-BRL). Tras 4 - 5 días de incubación a 28 °C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. Se realiza la infección vírica y la expresión de proteína como se describe en O'Reilly *et al.*, Baculovirus expresión vectores: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

60

Después se puede purificar PRO87299 expresado etiquetado con poli-his, por ejemplo, mediante cromatografía de

65

afinidad de Ni²⁺ quelante como sigue. Se preparan extractos de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe en Rupert *et al.*, Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, se lavan células Sf9, se resuspenden en tampón de tratamiento con ultrasonido (Hepes 25 ml, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10 %; NP-40 al 0,1 %; KCl 0,4 M), y se trata con ultrasonido dos veces durante 20 segundos en hielo. Las células tratadas con ultrasonido se clarifican mediante 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 filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (disponible de forma comercial de 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 A₂₈₀ de medida inicial con tampón de carga, punto en el que se inicia la recolección de fracciones. 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 de forma no específica la proteína unida. Tras alcanzar la A₂₈₀ de medida inicial otra vez, la columna se revela con un gradiente de imidazol de 0 hasta 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recolectan fracciones de 1 ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia de Western con Ni²⁺-NTA conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO87299 etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan frente a tampón de carga.

Como alternativa, la purificación de PRO87299 etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) se puede realizar utilizando técnicas de cromatografía conocidas, que incluyen por ejemplo cromatografía en columna de Proteína A o de proteína G.

Muchos de los polipéptidos PRO87299 divulgados en el presente documento se expresaron de forma satisfactoria como se describe anteriormente.

EJEMPLO 12: Preparación de anticuerpos que se unen a PRO87299

Los anticuerpos que se unen de forma específica a PRO87299 se generaron inmunizando ratones con la construcción PR087299-Fc. Esta construcción se preparó ligando la región que codifica el dominio extracelular de PR087299 (aminoácidos 1-155) en un plásmido que contiene un dominio Fc de ser humano, preparando así una quimera PR087299(ECD)-Fc. Esta proteína se produjo, purificó e inyectó en la almohadilla plantar de los ratones.

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, citado anteriormente. Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizaron con la quimera PRO87299(ECD)-Fc emulsificada en adyuvante de Freund completo y se inyectaron por vía subcutánea o intraperitoneal en una cantidad de aproximadamente 1-100 microgramos. Como alternativa, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas plantares traseras de los animales. 10 a 12 días más tarde los ratones inmunizados recibieron una dosis de refuerzo con quimera PRO87299(ECD)-Fc adicional emulsionada en el adyuvante seleccionado. Después de esto, durante varias semanas los ratones pueden también recibir dosis de refuerzo con inyecciones de inmunización adicionales. Se obtuvieron muestras de suero de los ratones de forma periódica mediante sangrado retroorbital, para el análisis en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti PRO87299.

Tras detectar un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos se inyectaron con una inyección intravenosa final de quimera PRO87299(ECD)-Fc. Tres a cuatro días más tarde se sacrificaron los ratones y se recogieron células esplénicas. Después, se fusionaron las células esplénicas (utilizando polietilenglicol al 35 %) con una línea celular de mieloma murina seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponible de la ATCC, n.º CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después se sembraron en placa en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos conteniendo medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, los híbridos de mieloma y los híbridos de células esplénicas.

Las células de hibridoma se exploraron en un ELISA para la reactividad frente a PRO87299. Se generaron nueve anticuerpos que se unían de forma específica a PRO87299. Las células de hibridoma positivas se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contenía los anticuerpos monoclonales anti PRO87299. Como alternativa, las células de hibridoma pueden crecerse en matraces o matraces rotatorios de cultivo de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis se llevó a cabo utilizando precipitación por sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, se puede emplear cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a Proteína A o a proteína G.

Como se indicó anteriormente, se generaron nueve (9) anticuerpos que se unían de forma específica a PRO87299. De estos nueve, se determinó que el anticuerpo denominado 5F5.1 era un anticuerpo agonista. La actividad agonista se determinó mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ se aislaron a partir de sangre humana como se describe anteriormente en el Ejemplo 2, y se cultivaron con anticuerpos entrecruzados unidos a la placa. Se prepararon placas de 96 pocillos mediante la incubación durante una noche a 37 °C con IgG anti ratón de cabra, a una concentración de 10 µg/ml y se lavaron con PBS para eliminar el exceso. Se añadieron anticuerpos anti CD3/anti CD28 a las placas recubiertas con IgG con y sin el anticuerpo anti PRO87229. La combinación de anti CD3 (0,1 µg/ml) y anti CD28 (0,25 µg/ml) estimula la proliferación de linfocitos T CD4⁺, y la adición del anticuerpo anti PRO87299 redujo 5 veces la proliferación, como se midió mediante la captación de

timidina (Figura 13). El anticuerpo anti CD3 solo no mostró proliferación y un control de anticuerpo tampoco lo hizo. La actividad agonista del anticuerpo 5F5.1 anti PRO87299 podría anularse mediante inactivación térmica. La línea de hibridoma 5F5.1 está depositada en la ATCC bajo el Tratado de Budapest (véase el Ejemplo 19).

5 Se realizó un segundo experimento utilizando anticuerpos solubles. Cuando se añadieron al medio de cultivo celular anti CD3 (10 µg/ml) y anti CD28 (5 µg/ml), también mostraron un aumento de la proliferación de linfocitos T CD4+. El anticuerpo anti PRO87299 añadido al medio de cultivo celular con dos anticuerpos estimuladores mostró una inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4+ de hasta el 50 %. El intervalo de anticuerpo anti PRO87299 utilizado fue de 5-200 µg/ml y la inhibición de la proliferación de linfocitos CD4+ fue dependiente de la dosis en este intervalo.

10 Un anticuerpo que se une de forma específica a PRO87299 pero que no tiene un efecto agonista es el anticuerpo 5E10. Se demostró que este anticuerpo reconoce a PRO87299 en linfocitos B primarios y linfocitos T CD4+. También podrían reconocerse células transfectadas con PRO87299 utilizando análisis de FACS. El anticuerpo 5E10, de forma consistente, no tenía efecto agonista.

15 Por lo tanto, se han generado anticuerpos que se unen de forma específica a PRO87299. Los anticuerpos antagonistas anti PRO87299 tienen utilidad en la estimulación de una respuesta inmunitaria que podría ser útil en el tratamiento de deficiencias inmunitarias y para proteger de la infección por patógenos. Por lo tanto, los anticuerpos agonistas anti PRO87299 tienen utilidad en reducir la proliferación de linfocitos T CD4+, disminuyendo la respuesta inmunitaria, y serían útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, del linfoma y de la enfermedad inflamatoria intestinal.

25 EJEMPLO 13: Purificación de los polipéptidos PRO87299 utilizando anticuerpos específicos

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

30 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero inmune ya sea mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Así mismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fluido ascítico de ratón mediante precipitación por sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se acopla de forma covalente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada por 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.

40 Tal columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO87299 preparando una fracción de células que contienen el polipéptido PRO87299 en una forma soluble. Esta preparación se obtiene mediante solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de detergente, o mediante otros métodos conocidos en la técnica. Como alternativa, el polipéptido PRO87299 soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células se cultivan.

45 Una preparación que contiene polipéptido PRO87299 soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferencial del polipéptido PRO87299 (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que rompen la unión anticuerpo/polipéptido PRO87299 (por ejemplo, un tampón de bajo pH tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración elevada de un caotropo tal como urea o ion tiocianato), y se recolecta el polipéptido PRO87299.

55 EJEMPLO 14: Cribado del fármaco

Esta invención es particularmente útil para el cribado de compuestos mediante el uso de polipéptidos PRO87299 o la unión de un fragmento del mismo, en cualquiera de diversas técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido PRO87299 o fragmento empleado en tal prueba puede estar libre en solución, fijado en un soporte sólido, sostenido sobre la superficie celular o emplazado de forma intracelular. Un método de cribado de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que están transformadas de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO87299 o un fragmento. Los fármacos se exploran frente a tales células transformadas en ensayos de unión competitivos. Tales células, ya sea en forma viable o fija, pueden utilizarse para ensayos de unión convencionales. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre polipéptido PRO87299 o un fragmento y el agente a probar. Como alternativa, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido PRO87299 y su célula diana o receptores diana, provocado por el

agente a probar.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de cribado de fármacos o de cualquier otro agente que pueda afectar una enfermedad o trastorno asociado al polipéptido PRO87299. Estos métodos comprenden poner en contacto tal agente con un polipéptido PRO87299 o fragmento del mismo y ensayar (i) la presencia de un complejo
5 entre el agente y el polipéptido PRO87299 o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO87299 o un fragmento y la célula, mediante métodos bien conocidos en la técnica. En tales ensayos de unión competitivos, el polipéptido PRO87299 o fragmento, normalmente está marcado. Tras la incubación adecuada, el polipéptido PRO87299 libre o fragmento se separa del que está presente en la forma unida, y la cantidad de
10 marcador libre o no formando complejo es una medida de la capacidad del agente particular para unirse al polipéptido PRO87299 o para interferir con el complejo polipéptido PRO87299/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un cribado de alto rendimiento de compuestos que tengan afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en el documento WO84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Indicado brevemente, se sintetizan en un sustrato sólido grandes cantidades de distintos
15 compuestos de prueba de péptido pequeño, tal como una punta plástica o alguna otra superficie. Tal como se aplica a un polipéptido PRO87299, los compuestos peptídicos de prueba se hacen reaccionar con el polipéptido PRO87299 y se lavan. El polipéptido PRO87299 unido se detecta mediante métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO87299 purificado también se puede recubrir de forma directa en placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el
20 péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos, en los que anticuerpos neutralizantes que tienen la capacidad de unirse al polipéptido PRO87299 compiten de forma específica con un compuesto de prueba por la unión al polipéptido PRO87299 o fragmentos del mismo. De esta manera, los
25 anticuerpos pueden utilizarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO87299.

EJEMPLO 15: Diseño racional de fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido PRO87299) o de moléculas pequeñas con las que puedan interactuar, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos puede utilizarse para diseñar fármacos que sean formas más activas o estables del polipéptido PRO87299 o que potencien, o interfieran con, la función del polipéptido PRO87299 *in vivo* (c.f. Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).
30

En una estrategia, la estructura tridimensional del polipéptido PRO87299, o de un complejo polipéptido PRO87299-inhibidor, se determina mediante cristalografía de rayos x, mediante modelado por ordenador o, más habitualmente, mediante una combinación de las dos estrategias. Deben determinarse tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO87299 para dilucidar la estructura y para determinar el sitio activo (o sitios activos) de la molécula.
35 De forma menos frecuente, la información útil respecto a la estructura del polipéptido PRO87299 se puede obtener mediante modelado a base de la estructura de proteínas homologas. En ambos casos, se utiliza información estructural relevante para diseñar moléculas similares al polipéptido PRO87299 análogas o para identificar inhibidores eficaces. Los ejemplos útiles del diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que tienen actividad o estabilidad mejorada como muestran Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31: 7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos como muestran Athauda *et al*, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).
40
45

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante un ensayo funcional, como se describe anteriormente, y entonces resolver su estructura cristalina. Esta estrategia, en principio, produce un farmanúcleo sobre el que se puede basar el diseño de fármacos posterior. Es posible saltarse completamente la cristalografía de proteínas generando anticuerpos antiidiotipo (anti ids) para un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como una imagen especular de una imagen especular, se esperaría que el sitio de unión de los anti ids fuese un análogo del receptor original. El anti id después podría utilizarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos en forma química o biológica. Después, los péptidos aislados actuarían como el farmanúcleo.
50
55

En virtud de la presente invención, pueden hacerse disponibles cantidades suficientes del polipéptido PRO87299 para realizar tales estudios analíticos, como la cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO87299 proporcionada en el presente documento proporcionará guía para los que emplean las técnicas de modelado por ordenador, en lugar de o además de la cristalografía de rayos x.
60

EJEMPLO 16 - PRO87299 se une de forma específica a HVEM

El cribado de la biblioteca de proteínas determina que PRO87299 se une de forma específica a HVEM. El dominio extracelular de PRO87299 se fusionó con el Fc de ser humano para crear PRO87299(ECD)-Fc. Esta proteína de fusión se acopló por amina a un chip sensor Biacore™ (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) CM5 a aproximadamente
65

9000 unidades de respuesta como se describe de forma general en Chen, Y. *et al.*, J. Mol Biol 293: 865-881 (1999). Brevemente, se activaron con hidrocarburo de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del suministrador, chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore™ Inc.). PRO87299(ECD)-Fc se diluyó e inyectó a un caudal hasta conseguir
5 aproximadamente 9000 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. En una segunda celda de flujo en el mismo chip se acopló con amina una proteína de control, PR04346-Fc humana (número de registro del Genbank AK057097), a aproximadamente 18500 unidades de respuesta. Se realizó una inyección de etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no habían reaccionado. Después, se inyectaron proteínas individuales procedentes de la biblioteca de proteínas SPDI, que consiste en aproximadamente 2000 proteínas, a una concentración de 2 µg/ml y
10 se evaluó la unión mediante el cambio en las unidades de respuesta en función del tiempo. Se encontró que HVEM se une a PRO87299(ECD)-Fc, pero no al control PR04346-Fc. Como se muestra en la Figura 14, la asociación de PRO87299 y HVEM da como resultado el aumento significativamente elevado de 1200 unidades de respuesta por encima del control. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon utilizando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (programa informático de evaluación BIAcore™ versión 3.2) mediante el
15 ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} .

Como se muestra en la Figura 15, PRO87299 se une de forma selectiva a HVEM. En este experimento, PRO87299(ECD)-Fc y los miembros de la familia CD28 hCTLA4-Fc, hPD-1-Fc, hICOS-Fc o hCD28-Fc, estaban
20 acoplados por amina a un chip Biacore™ CM5 en aproximadamente 8000 unidades de respuesta. Después, cada uno se ensayó por su capacidad para unirse a HVEM. Se preparó una proteína HVEM-Fc ligando los ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos 1-199 de HVEM a un Fc, dando como resultado una proteína de fusión HVEM-Fc. Esta HVEM-Fc se clonó en un vector de expresión que produce la proteína de fusión cuando se transfecta de forma estable en células CHO. Todas las proteínas etiquetadas con Fc se purificaron hasta más del
25 90 % de pureza mediante cromatografía de afinidad, utilizando Proteína A Sepharose™ (Amersham). El resultado fue HVEM-Fc 2 µg/ml inyectada a 5 µl/min unida de forma selectiva a PRO87299 y no al otro miembro de los miembros de la familia CD28 probados. La actividad de cada miembro de la familia CD28 se confirmó como positiva probando la respuesta de unión para sus ligandos conocidos (datos no mostrados) (los miembros de la familia CD28 y los ligandos se adquirieron de R&D systems).

La unión de PRO87299 a HVEM es dependiente del pH, pero independiente de la concentración de NaCl. Utilizando el ensayo de Biacore™ como se describe anteriormente, dos purificaciones independientes de HVEM-Fc se unen a
30 PRO87299 acoplado por amina a un chip Biacore™ CM5. Como se muestra en la Figura 16, la unión no se rompió por el tratamiento con NaCl 2,5M, pero el complejo PRO87299/HVEM podría desasociarse con glicina 10 mM a pH 3,0.

La interacción PRO87299/HVEM puede bloquearse mediante anticuerpos para PRO87299. En este experimento, HVEM-Fc se acopló por amina a un chip sensor Biacore™ CM5 a aproximadamente 7500 unidades de respuesta. Las inyecciones de PRO87299(ECD)-Fc se realizaron a dos minutos a un caudal de 5 ml/min. 105 segundos tras
40 inyección se registraron las unidades de respuesta (UR). PRO87299(ECD)-Fc (8 nM) proporcionó una respuesta de 100 UR. Se premezcló cada anticuerpo a concentraciones crecientes con PRO87299(ECD)-Fc (8 nM) y se incubó durante 1 h. La unión de cada muestra se midió después en orden aleatorio y por duplicado, y se utilizó glicina 10 mM pH 2,5 para regenerar la superficie de unión tras cada inyección. Como se muestra en la Figura 18, los anticuerpos 5E10 y 3B1.9 anti PRO87299 bloquearon la unión de PRO87299 a HVEM en una manera dependiente
45 de la concentración, mientras que el anticuerpo agonista 5F5.1 no tenía efecto bloqueante. Las inyecciones de anticuerpos solos no mostraron unión a HVEM inmovilizado (datos no mostrados). Las concentraciones se calcularon a base del peso molecular reducido aparente de PRO87299(ECD)-Fc (55 kDa) y una masa de anticuerpo de 150 kDa.

PRO87299 se une a HVEM en un ensayo basado en células. En este experimento se cultivaron células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos, en medio tal como DMEM
50 complementado con suero fetal de ternero y, de forma opcional, componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-HVEM se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen VA RNA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 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 la célula 293, y se permite que se deposite durante aproximadamente 4 horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Después, las células 293 se lavan con
55 medios sin suero, se añade medio recién preparado y las células se incuban durante aproximadamente 5 días. Como alternativa, se mezclan 10 µg de ADN de pRK5-HVEM con reactivo LipofectAMINE™ (Gibco/BRL, Gaithersburg MD) y se realiza la transfección siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras transfectar las células 293 con HVEM, se incubaron con PRO87299(ECD)-Fc radiomarcado con ¹²⁵I y se permitió que se produzca la unión. El PRO87299 radiomarcado se hizo competir después con PRO87299(ECD)-Fc no marcado, y se determinaron el número estimado de sitios de unión totales y la constante de disociación (Kd) mediante análisis de Scatchard. La
60 Figure 17(A) es una representación de Scatchard y la Figura 17(B) es una representación de desplazamiento que muestra la unión de PRO87299(ECD)-Fc a HVEM transfectado de forma transitoria en células. Este dato demuestra

que la Kd de PRO87299 es aproximadamente 25 nM. La unión total de PRO87299(ECD)-Fc radiomarcado a células 293 HEK transfectadas de forma simulada fue del 2,5 % de la de las células transfectadas con HVEM (datos no mostrados). Utilizando esta metodología se determinó la afinidad de las interacciones HVEM/LIGHT/PRO87299. Esto se muestra en la Tabla 7 a continuación.

5

Tabla 7

Proteína expresada	Ligando	Kd (nM)
HVEM	I-125-PRO87299-Fc	25
HVEM	I-125-LIGHT-FLAG	2,5
PRO87299	I-125-HVEM-Fc	5,5
LIGHT	I-125-HVEM-Fc	7
PRO87299/LIGHT	I-125-HVEM-Fc	0,5

El anticuerpo anti PRO87299 (3B1.9) compitió de forma dependiente de la dosis con la unión de PRO87299(ECD)-Fc a HVEM como se discute anteriormente en este Ejemplo.

10

Tomados juntos, estos datos demuestran que PRO87299 se une de forma específica a HVEM, como se determinó mediante la evaluación a través de la interacción proteína-proteína, del bloqueo proteína-anticuerpo y del análisis *in vivo*.

15 EJEMPLO 17 - PRO87299 y LIGHT pueden unirse de forma simultánea a HVEM.

Las publicaciones han mostrado que LIGHT (N.º de registro del GenBank: NM_172014, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6) puede unirse a HVEM (Marsters, S.A. *et al.*, Curr. Biol. 8 (9), 525-528 (1998). Mauri D.N. *et al.*, Immunity (8), 21-30, (1998)). Para confirmar que LIGHT y PRO87299 pueden unirse de forma simultánea a HVEM, los inventores realizaron un experimento de unión. HVEM-Fc se acopló por amina al chip sensor Biacore™ CM5 a ~150 unidades de respuesta. La cantidad más baja de HVEM-Fc inmovilizada fue importante para alcanzar casi la saturación de la unión de PRO87299-Fc. La Figura 19 muestra que LIGHT (25 nM) y PRO87299-Fc (17 nM) se inyectaron de forma independiente a 5 µl/min durante 1200 segundos (curvas roja y azul, respectivamente). Después, se inyectó una mezcla de LIGHT y PRO87299-Fc en las mismas concentraciones finales de una manera idéntica (curva verde). La suma calculada de los sensogramas de LIGHT y PRO87299-Fc inyectados de forma individual (curva gris) coincidió de forma estrecha con los datos experimentales, confirmando que LIGHT y PRO87299 tienen la capacidad de unirse a HVEM de forma simultánea. Las concentraciones fueron a base del peso molecular monomérico de LIGHT de 25 kDa y el peso molecular reducido de PRO87299-Fc (55 kDa).

La interacción de PRO87299 con HVEM no se bloquea mediante LIGHT. Se acopló por amina PRO87299-Fc a un chip sensor Biacore™ CM5 a ~9800 unidades de respuesta. Se incubó LIGHT (adquirido de Alexis™, n.º de cat. 552-018-C010) en concentraciones crecientes con HVEM 4 nM durante 1h. Como se muestra en la Figura 20, la unión PRO87299-Fc/HVEM no se bloquea mediante concentraciones crecientes de LIGHT hasta una concentración final de 300 nM. La actividad de LIGHT se confirmó mediante la unión a HVEM-Fc inmovilizado sobre un chip sensor CM5 (datos no mostrados). LIGHT solo no se une a PRO87299-Fc inmovilizado (datos no mostrados). Todos los sensogramas de unión se llevaron a cabo en orden aleatorio y por duplicado. Las unidades de respuesta se registraron como la diferencia entre la medida inicial y 15 segundos antes de la finalización de una inyección de 2 min a 5 ml/min. Las concentraciones son a base de los pesos moleculares de 25 kDa para el monómero de LIGHT y de 55 kDa para HVEM monomérico. Estos datos demuestran que LIGHT no bloquea la unión de HVEM a PRO87299.

HVEM se identificó de forma inicial como el receptor celular para la entrada del virus del herpes simple 1 (HSV-1) en la célula, y se demostró que se une a la glicoproteína D (gD) del HSV-1 (Mongomery *et al.*, Cell 87:427-436 (1996)). HVEM contiene tres dominios ricos en cisteína (CRD), que es una característica estructural común para todos los miembros de la familia TNFR. La resolución de la estructura cristalina de la proteína gD formando complejo con HVEM mostró que el primer CRD de HVEM se une a la proteína gD, mientras que el segundo CRD de HVEM proporciona soporte estructural para el primer CRD (Carfi *et al.*, Mol. Cell 8: 169-179 (2001)). El resultado es que PRO87299 interactúa con LIGHT y no compite por la unión a HVEM, conduciendo a la hipótesis de que PRO87299 interactúa con la cara externa del complejo HVEM/LIGHT. Para probar esta hipótesis, se generó un péptido derivado de fago (BP-2) que tiene la capacidad de bloquear la unión de HVEM a la glicoproteína D (gD) del herpes, pero no a LIGHT (Sarrías *et al.*, Mol. Immuno. 37:665-673: (2000)). A concentraciones que inhiben la unión de gD, BP-2 inhibió la unión de PRO87299 a HVEM (Figura 21A). En una comparación directa, una forma Δ290-299 de la proteína gD recombinante (Milne *et al.*, J Virology. 77:8962-8972 (2003)) también inhibió la unión de HVEM a PRO87299 (Figura 21B). Este resultado se repitió en ensayos de unión celulares que mostraron que gD recombinante (Δ290-299) inhibe la unión de PRO87299-Fc soluble y de HVEM-Fc a células 293 que expresan HVEM o PRO87299 (Figura 21C y D respectivamente). Estos resultados indican que PRO87299 interactúa con el primer CRD de HVEM en un sitio que es distinto del sitio de unión de LIGHT. El descubrimiento de que PRO87299 interactúa con LIGHT y HVEM permitirá la generación de anticuerpos o de moléculas pequeñas frente a HVEM que pueden inhibir de forma selectiva la

55

interacción PRO87299/HVEM sin romper la interacción PRO87299/LIGHT. Otro tipo de anticuerpo o molécula pequeña que este descubrimiento contempla es una que bloqueará la interacción PRO87299/HVEM y la interacción PRO87299/LIGHT. Estas dos clases distintas de moléculas pueden tener efectos terapéuticos distintos.

5 EJEMPLO 18: PRO87299 inhibe la activación de linfocitos de T.

Como se mencionó en el Ejemplo 1, se clonó PRO87299 para la investigación adicional de proteínas que contienen el dominio ITIM. El dominio intracelular de PRO87299 contiene dos dominios ITIM que se fosforilan de forma inducible, lo que permite la incorporación y la unión de SHP-1 y SHP-2, lo que indica que la función de PRO87299 es inhibidora (Watanabe N., *et al.*, Nature Immuno. 1-10 (2003)). En este experimento, se estimularon linfocitos CD4+ primarios con distintas concentraciones de anticuerpo anti CD3 inmovilizado. También se entrecruzaron en la placa utilizando un anticuerpo anti Fc prerrecubierto proteínas de control etiquetadas con Fc, HVEM-Fc o DcR3-Fc. La proliferación de los linfocitos T CD4+ se midió por la incorporación de timidina H3 tras una incubación de 72 horas. Este experimento se realizó en pocillos por triplicado, y la inhibición se muestra como un promedio (Figura 22A). Se formuló la hipótesis de que HVEM es inhibidor de la proliferación de linfocitos T debido a su bloqueo de LIGHT. Este experimento muestra que no es la represión de HVEM/LIGHT sino la activación de PRO87299 por HVEM lo que provoca la reducción de la proliferación de linfocitos T.

Para demostrar adicionalmente que PRO87299 es inhibidor para las proliferaciones de linfocitos T, el experimento se realizó como se describe anteriormente, pero incluyendo el anticuerpo 3B1.9 inhibidor anti PRO87299. Se demostró que el anticuerpo 3B1.9 bloquea la unión de PRO87299 a HVEM (véase el Ejemplo 16). Cuando se estimularon los linfocitos T CD4+ mediante anti CD3 inmovilizado en placa y +/- HVEM. Después, se añadieron al medio el anticuerpo 3B1.9 y un anticuerpo de control. Los datos muestran que el anticuerpo 3B1.9 puede interferir con la interacción PRO87299/HVEM y así descargar a la célula de la señal inhibidora. El resultado es que las células tratadas con 3B1.9 proliferaron a la misma velocidad que las células no tratadas (Figura 22B). El anticuerpo 3B1.9 fue ineficaz solo cuando se utilizaron grandes concentraciones de HVEM. Este dato demuestra que PRO87299 o los anticuerpos agonistas podrían tener utilidad en suprimir las enfermedades autoinmunitarias relacionadas con los linfocitos T, o de forma opuesta, los anticuerpos antagonistas tales como 3B1.9 podrían ser útiles en la estimulación de linfocitos T para proteger de la infección por patógenos.

30 EJEMPLO 19: Enfermedad del injerto contra el hospedador

La enfermedad del injerto contra el hospedador se produce cuando se trasplantan células inmunocompetentes en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Los linfocitos T donantes reconocen los antígenos del hospedador y se activan, secretan citocinas, proliferan y se diferencian en células efectoras. Esta respuesta se conoce como reacción del injerto contra el hospedador (GVHR). La respuesta GVHR comprende un síndrome multiorgánico y los efectos pueden variar desde inflamación grave con peligro para la vida hasta casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos en ratón de la enfermedad del injerto contra el hospedador se han utilizado para modelar los trastornos clínicos de la GVHR aguda y crónica que se producen tras el trasplante de médula ósea y en las enfermedades autoinmunitarias. Se describe un procedimiento general con detalle en Current Protocols in Immunology, citado anteriormente, unidad 4.3. En este caso, se purificaron CMSP humanas de la capa leucocitoplaquetaria de un donante normal mediante gradiente de Ficoll, los linfocitos CD8 y NK se empobrecieron utilizando kits de empobrecimiento de linfocitos CD8 y NK de MACS. En el día 0 se inyectaron 40x10⁶ células en ratones Beige SCID hembra de 8-10 semanas de edad. Se inyectaron por vía intravenosa 100 µg de HVEM-Fc o de proteína de control en los días 0, 2, 4, 6, 8, 10. Como se muestra en la Figura 23, la activación de PRO87299 por HVEM-Fc en un modelo de GVHR, prolongó de forma significativa la supervivencia. Los ratones no tratados con HVEM-Fc tenían una mortalidad del 100% en el 13 de posreconstitución. Los ratones tratados con HVEM-Fc vivieron hasta el día 19 posreconstitución en un procedimiento y hasta el día 30 posreconstitución en el otro. Este resultado indica que la activación de PRO87299 por un agonista podría ser útil en el trasplante de tejidos, en donde la administración de un agonista de PRO87299 prevendría o aliviaría el rechazo de tejido transplantado por parte del hospedador.

50 EJEMPLO 20: Depósito de materiales

La siguiente línea celular de hibridoma se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA (ATCC):

<u>Denominación del hibridoma/anticuerpo</u>	<u>N.º ATCC</u>	<u>Fecha de depósito</u>
Btig5F5.1	PTA del 10 de noviembre de 2004	6302
Btig3B 1.9	PTA del 10 de noviembre de 2004	6301

Este depósito se hizo bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materias de Patentes y las Regulaciones allí expuestas (tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años a partir de la fecha de depósito. La línea celular se hará disponible por la ATCC bajo las condiciones del tratado de Budapest, y se someterá a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegure (a) que el acceso al cultivo esté disponible

durante la tramitación de la solicitud de patente hasta que el Comisionado determine que se concede el derecho en virtud de 37 CFR §1.14 y 35 USC §122, y (b) que todas las restricciones sobre la disponibilidad al público del cultivo así depositado se eliminen de forma irrevocable tras la concesión de la patente.

- 5 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que, si el cultivo en depósito deba morir o perderse o destruirse cuando se cultiva en condiciones adecuadas, tras la notificación se reemplazará inmediatamente por una muestra viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la línea celular depositada no se considera como una autorización para practicar la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno, en conformidad con sus leyes sobre patentes.
- 10 La anterior memoria descriptiva redactada se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica practique la invención. El material depositado no limita el ámbito de la presente invención, dado que se pretende que la realización depositada sea solo una ilustración individual de determinados aspectos de la invención, y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente está dentro del ámbito de la presente invención. El depósito del material del presente documento no constituye una admisión de que la descripción redactada contenida en el
- 15 presente documento sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se entiende que el ámbito de las reivindicaciones esté limitado por las ilustraciones específicas que representa. De hecho, a partir de la descripción anterior, serán obvias para los expertos en la materia las diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une de forma específica a PR087299 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 2 y bloquea la interacción de HVEM con PR087299.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
- 10 3. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que se produce mediante el hibridoma Btig3B1.9 (N.º de registro de la ATCC 6301).
4. Una composición de materia que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. Un artículo de fabricación, que comprende:
- un envase;
 - una etiqueta en dicho envase; y
 - una composición de materia que comprende un anticuerpo como en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, contenida dentro de dicho envase, en donde la etiqueta en dicho envase indica que dicha composición de materia puede utilizarse para tratar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario.
- 20 6. Un anticuerpo anti PR087299 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un fragmento del mismo, para su uso en un método para aliviar en un mamífero un trastorno relacionado con el sistema inmunitario.
- 25 7. Un método para determinar la presencia de un polipéptido PR087299 que tenga la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 2, en una muestra que se sospecha que contiene dicho polipéptido, comprendiendo dicho método exponer dicha muestra a:
- 30 (a) un anticuerpo anti PR087299 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3; o
(b) HVEM, HVEM-Fc o un fragmento de los mismos;
- y determinar la unión de (a) o de (b) a PR087299.
- 35 8. Un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero, comprendiendo dicho método poner en contacto:
- 40 (a) un anticuerpo anti PR087299 como en cualquiera de las reivindicaciones 1-3; o
(b) HVEM, HVEM-Fc o un fragmento de los mismos, que se une de forma específica a PR087299 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2;
- 45 con una muestra de prueba de células de tejido obtenida de dicho mamífero, y detectar la formación de un complejo entre (a) o (b) y el polipéptido PR087299 en la muestra de prueba, en donde la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero del cual se obtuvieron las células de tejido de prueba.
- 50 9. Un anticuerpo anti PR087299 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en un método para aliviar en un mamífero una enfermedad infecciosa o una enfermedad por inmunodeficiencia.

FIGURA 1

CCTCGGTTCTPATCGATTGAATTCATGAAGACATTGCCTGCCATGCTTGGAAGTGGGAAAT
TATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGACATCTGGAACATCCATGGGAAAAGAAT
CATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATCTTAGCAGGAGATC
CCTTTGAACTAGAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCTCATGTGACTTGGTGCA
AGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACCTTGAAGATAGACAAAACAAGTTGGAAGGAAGAGA
AGAACATTTCAATTTTCATTCTACATTTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTTCAT
ACCGCTGTTCTGCAAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACCTTTTATG
TGACAGATGTAAAAAGTGCTTCAGAACGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCT
GGCTCCTGTATAGTTTACTTCCTTTGGGGGGATTGCCTCTACTCATCACTACCTGTTTCT
GCCTGTTCTGCTGCCCTGAGAAGGCACCAAGGAAAGCAAAATGAACTCTCTGACACAGCAG
GAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAAACAGAAGCAAGCACCA
GGCAAAATTCCCAAGTACTGCTATCAGAACTGGAATTTATGATAATGACCTGACCTTT
GTTTCAGAAATGCAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAAC
CAGGCATGTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTCAATGGACTGAACTCAAGACTGGCAA
GAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGGAGTTAAGGATCCT
CTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA
GTGTTACAAATAAACAAATAATTTCTCAATTTGAGAATTTTACTTTAGAAATGTTCA
TGTTAGTGCTTGGGTCTGAAGGGTCCATAGGACAAATGATTTAAAAT

FIGURA 2

MKTLPAMLGTGKLFVWFLLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPV
KYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQ
SNLIESHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLITTCFLFCCLRR
HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGS
EVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

Secuencia señal
ninguna

Dominio transmembrana
153-173

Sitio de N-glucosilación.

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

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y GMPc.

41-44

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa.

31-39

Sitio de N-miristoilación.

111-116
224-229
254-259

Dominio ITIM
255-260

Dominio ITISM
280-285

Dominio de inmunoglobulina
51-117

FIGURA 3

GCCGCAGCAATGGCGCTGAGTTCCTCTGCTGGAGTTCATCCTGCTAGCTGGGTTCCCGAG
CTGCCGGTCTGAGCCTGAGGCATGGAGCCTCCTGGAGACTGGGGGCTCCTCCCTGGAGA
TCCACCCCAAGAACCGACGTCTTGAGGCTGGTGTGTATCTCACCTTCCCTGGGAGCCCC
TGCTACGCCCCAGCTCTGCCGTCCTGCAAGGAGGACGAGTACCCAGTGGGCTCCGAGTGC
TGCCCCAAGTGCAGTCCAGGTTATCGTGTGAAGGAGGCCTGCGGGGAGCTGACGGGCACA
GTGTGTGAACCCTGCCCTCCAGGCACCTACATTGCCACCTCAATGGCCTAAGCAAGTGT
CTGCAGTGCCAAATGTGTGACCCAGCCATGGGCCTGCGCGGAGCCGGAAC TGCTCCAGG
ACAGAGAACGCCGTGTGTGGCTGCAGCCAGGCCACTTCTGCATCGTCCAGGACGGGGAC
CACTGCGCCGCGTGGCGGCTTACGCCACCTCCAGCCCGGGCCAGAGGGTGCAGAAGGGA
GGCACCGAGAGT CAGGACACCCTGTGT CAGAACTGCCCCCGGGGACCTTCTCTCCAAT
GGGACCCTGGAGGAATGT CAGCACCCAGACCAAGTGCAGCTGGCTGGTGACGAAGGCCGGA
GCTGGGACCAGCAGCTCCCACTGGGTATGGTGGTTTCTCTCAGGGAGCCTCGTCATCGTC
ATTGTTTGCTCCACAGTTGGCCTAATCATATGTGTGAAAAGAAGAAAGCCAAGGGGTGAT
GTAGTCAAGGTGATCGTCTCCGTCCAGCGGAAAAGACAGGAGGCAGAAGGTGAGGCCACA
GTCATTGAGGCCCTGCAGGCCCTCCGGACGTCAACACGGTGGCCGTGGAGGAGACAATA
CCCTCATTACGGGGAGGAGCCCAAACCACTGACCCACAGACTCTGCACCCCGACGCCAG
AGATACCTGGAGCGACGGCTGCTGAAAGAGGCTGTCCACCTGGCGAAACCACCGGAGCCC
GGAGGCTTGGGGGCTCCGCCCTGGGCTGG

FIGURA 4

MEPPGDWGPWPWRSTPRTDVLRLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYFVGSECCPKCSPG
YRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGLRASRNCSTENAVCG
CSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTESQDTLQNCPPGTFSPNGTLEECQ
HQTKCSWLVTKAGAGTSSSHWVWFVLSGSLVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVS
VQRKRQEAEGEATVIEALQAPPDVTTVAVEETIPSFTRSPNH

Secuencia señal

1-36

Dominio transmembrana

201-221

Sitio de N-glucosilación.

110-114

173-177

Sitio de N-miristoilación.

81-87

89-95

104-110

120-126

153-159

193-199

195-201

220-226

Secuencia de acoplamiento celular

231-234

Región rica en cisteína TNFR/NGFR

42-75

78-119

FIGURA 5

GGTTTCCTCTGAGGTTGAAGGACCCAGGCGTGTTCAGCCCTGCTCCAGACACCTTGGGCAT
GGAGGAGAGTGTTCGTACGGCCCTCAGTGTFTTGTGGTGGATGGACAGACCGACATCCCATT
CACGAGGCTGGGACGAAGCCACCGGAGACAGTCGTGCAGTGTGGCCCGGGTGGGTCTGGG
TCTCTTGCTGTTGCTGATGGGGGCCGGGCTGGCCGTCCAAGGCTGGTTTCCTCCTGCAGCT
GCAC'TGGCGTCTAGGAGAGATGGTFCACCCGCC'TGCC'TGACGGACCTGCAGGC'TCCTGGGA
GCAGCTGATACAAGAGCGAAGGTCTCACGAGGTCAACCCAGCAGCGCATCTCACAGGGGC
CAACTCCAGCTTGACCGGCAGCGGGGGGCCGCTGTTATGGGAGACTCAGCTGGGCCTGGC
CTTCCTGAGGGGCCCTCAGCTACCACGATGGGGCCCTTGTGGTCACCAAAGCTGGCTACTA
CTACATCTACTCCAAGGTGCAGCTGGGCGGTGTGGGCTGCCCGCTGGGCTGGCCAGCAC
CATCACCCACGGCCTCTACAAGCGCACACCCCGCTACCCCGAGGAGCTGGAGCTGTTGGT
CAGCCAGCAGTACCCCTGCGGACGGGCCACCAGCAGCTCCCGGGTCTGGTGGGACAGCAG
CTTCCTGGGTGGTGTGGTACACCTGGAGGCTGGGGAGGAGGTGGTTCGTCCGTGTGCTGGA
TGAACGCCTGGTTCGACTGCGTGTATGGTACCCGGTCTTACTTCGGGGCTTTCATGGTGTG
AAGGAAGGAGCGTGGTGCATTGGACATGGGTCTGACACGTGGAGAACTCAGAGGGTGCCT
CAGGGGAAAGAAAACCTCACGAAGCAGAGGCTGGGCGTGGTGGCTCTCGCCTGTAATCCCA
GCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCGGATCACCTGAGGTGAGGAGTTCGAGACCAGCCTGG
CTAACATGGCAAAAACCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGACGTGGTGGTGC
CTGCCTGTAATCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGATAATTTTGCTTAAACCCGGGAG
GCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACACCACTGCACCTCCAACCTGGGAAACGCAGTGAG
ACTGTGCCTCAAAAAAAG

FIGURA 6

MEE SVVRPSV FVVDGQTDI PFTRLGRSHRRQSCSVARVGLG LLLLLLMGAGLAVQGWFLLO
LHWRLGEMVTRL PDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPA AHLTGANS SLTGSGGPLLWETQLGL
AFLRGLSYHDGALVVT KAGY Y IY SKVQLGGVGCPLGLASTI THGLYKRTPRYPEELELL
VSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRV LDERLVRLRDGTRSYFGAFMV

Secuencia señal
ninguna

Dominio transmembrana
ninguno

Sitio de N-glicosilación.

102-106

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y GMPc.

29-33

Sitio de N-miristoilación.

48-54

100-106

153-159

157-163

Patrón de cremallera de leucina

44-66

51-73

FIGURA 7

ATGAAGACATTCCTGCCATGCTTGGAAGTGGGAAATTAATTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGAC
ATCTGGAACATCCATGGGAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATC
TTAGCAGGAGATCCCTTTGAACTAGAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCTCATGTGACTTGGTGC
AAGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACCTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGAAGAACATTTCA
TTTTTCATTCACATTTTGAACCAGTGTTCCTAATGACAATGGGTCATACCGCTGTTCTGCAAATTTTCAG
TCTAATCTCATTTGAAAGCCACTCAACAACCTCTTTATGTGACAGGAAAGCAAAATGAACTCTCTGACACAGCA
GGAAGGGAAATTAACCTGGTGTGATGCTCACCTTAAGAGTGTAGCAAACAGAAGCAAGCACCCAGGCAAAATTC
CAAGTACTGCTATCAGAACTGGAATTTATGATAATGACCCTGACCTTTGTTTCAGGATGCAGGAAGGGTCT
GAAGTTTATTTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAAACCAGGCATTGTTTATGCTTCCCTGAACCATTCTGTC
ATTGGACTGAACTCAAGACTGGCAAGAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATATGCATCCATATGTGTGAGG
AGTTAA

FIGURA 8

MKTLPAMLGTGKLEFWVFFLIPLYLDIWNHIGKESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANR
PHVTWCKLNGTTCVKLEDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLY
VTGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNP
CLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

Secuencia señal
ninguna

Dominio transmembrana
ninguno

Sitio de N-glicosilación.
75-79
94-98
110-114
213-217

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y GMPc.
41-45

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa.
31-40

Sitio de N-miristoilación.
111-117
176-182
206-212

Dominio de inmunoglobulina
51-117

Dominio ITIM
207-212

Dominio ITISM
232-237

FIGURA 9

ATGAAGACATTGCCCTGCCATGCTTGGAAC TGGGAAATTATTTTGGGTCTTCTTCTTAATCCCATATCTGGAC
ATCTGGAACATCCATGGGAAAAGAATCATGTGATGTACAGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCCATC
TTAGCAGGAGATCCCTTTGAACTAGAATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGCCCTCATGTGACTTGGTGC
AAGCTCAATGGAACAACATGTGTAAAACCTTGAAGATAGACAAACAAGTTGGAAGGAAGAGAAGAACATTTCA
TTTTTCATTCTACATTTTGAACCAGTGCTTCCTAATGACAATGGGTTCATACCGCTGTTCTGCAAAATTTTCAG
TCTAATCTCATTGAAAGCCACTCAACAACCTCTTTATGTGACAGCATTACTAACATTCAGATGTAAAAAGT
GCCTCAGAACGACCCTCCAAGGACGAAATGGCAAGCAGACCCTGGCTCCTGTATAGTTTACTTCCTTTGGGG
GGATFGCCTCTACTCATCACTACCTGTTTCTGCCTGTTCTGCTGCCTGAGAAGGCACCAAGGAAAGCAAAT
GAACTCTCTGACACAGCAGGAAGGGAAATTAACCTGGTTGATGCTCACCTTAAGAGTGAGCAAACAGAAGCA
AGCACCAGGCAAAATTCCTCAAGTACTGCTATCAGAACTGGAATTTATGATAATGACCTTGACCTTTGTTTC
AGGATGCAGGAAGGGTCTGAAGTTTATTCTAATCCATGCCTGGAAGAAAACAACCAGGCATTGTTTATGCT
TCCCTGAACCATTCCTGTCATFGGACTGAACTCAAGACTGGCAAGAAATGTAAAAGAAGCACCAACAGAATAT
GCATCCATATGTGTGAGGAGTTAA

FIGURA 10

MKTLPAMLG TGKLFWVFFLI PYLDIWN IHGKESCDVQLYIKRQSEHS ILAGDPFELECPVKYCANRPHVTC
KLN GTTCVKLEDRQTSWKEEKNI SFFILHFEFVLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTFLYVTAFTNIPDVKS
ASERPSKDEMASRPWLLYSLLPLGGLPLLI TTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEA
STRQNSQVLLSETGIYDNDPDL CFRMQEGSEVYSNP CLEENKPGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEY
ASICVRS

Secuencia señal
ninguna

Dominio transmembrana
158-178

Sitio de N-glucosilación.
75-79
94-98
110-114
267-271

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y GMPc.
41-45

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa.
31-40

Sitio de N-miristoilación.
111-117
230-236
260-266

Dominio ITIM
261-266

Dominio ITISM
286-291

FIGURA 11B

1012-25	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1013-35	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1020-40	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1072-45	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1075-49	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1075-51	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1076-59	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
1077-62	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1086-67	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1086-69	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
330-8	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1013-34	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1020-38	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
1072-47	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1076-58	134	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	183
1077-61	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
1096-75	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
1112-95	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
310-4	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
362-14	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
330-10SE	133	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	182
362-13	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200
1098-83SE	151	GGAGATCCCTTGAACCTAGAAATGCCCGTGGAAATACCTGGTAAACAGGCGC	200

1012-25	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1013-35	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1020-40	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1072-45	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1075-49	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1075-51	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1076-59	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
1077-62	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1086-67	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1086-69	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
330-8	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1013-34	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1020-38	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
1072-47	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1076-58	184	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	233
1077-61	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
1096-75	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
1112-95	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
310-4	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
362-14	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
330-10SE	183	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	232
362-13	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250
1098-83SE	201	TCATGTTGACCTGGTGCCTAAGCCCAATGGAAACCAACAAGTGGTAAACCTGCAAG	250

1012-25	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1013-35	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1020-40	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1072-45	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1075-49	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1075-51	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1076-59	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
1077-62	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1086-67	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1086-69	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
330-8	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1013-34	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1020-38	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
1072-47	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1076-58	234	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	283
1077-61	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
1096-75	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
1112-95	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
310-4	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
362-14	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
330-10SE	233	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	282
362-13	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300
1098-83SE	251	ATAAGACA AACAAAGTTGGAAAGGAAAGAGAAGAA CATTTCATTTTCCATTCC	300

FIGURA 11D

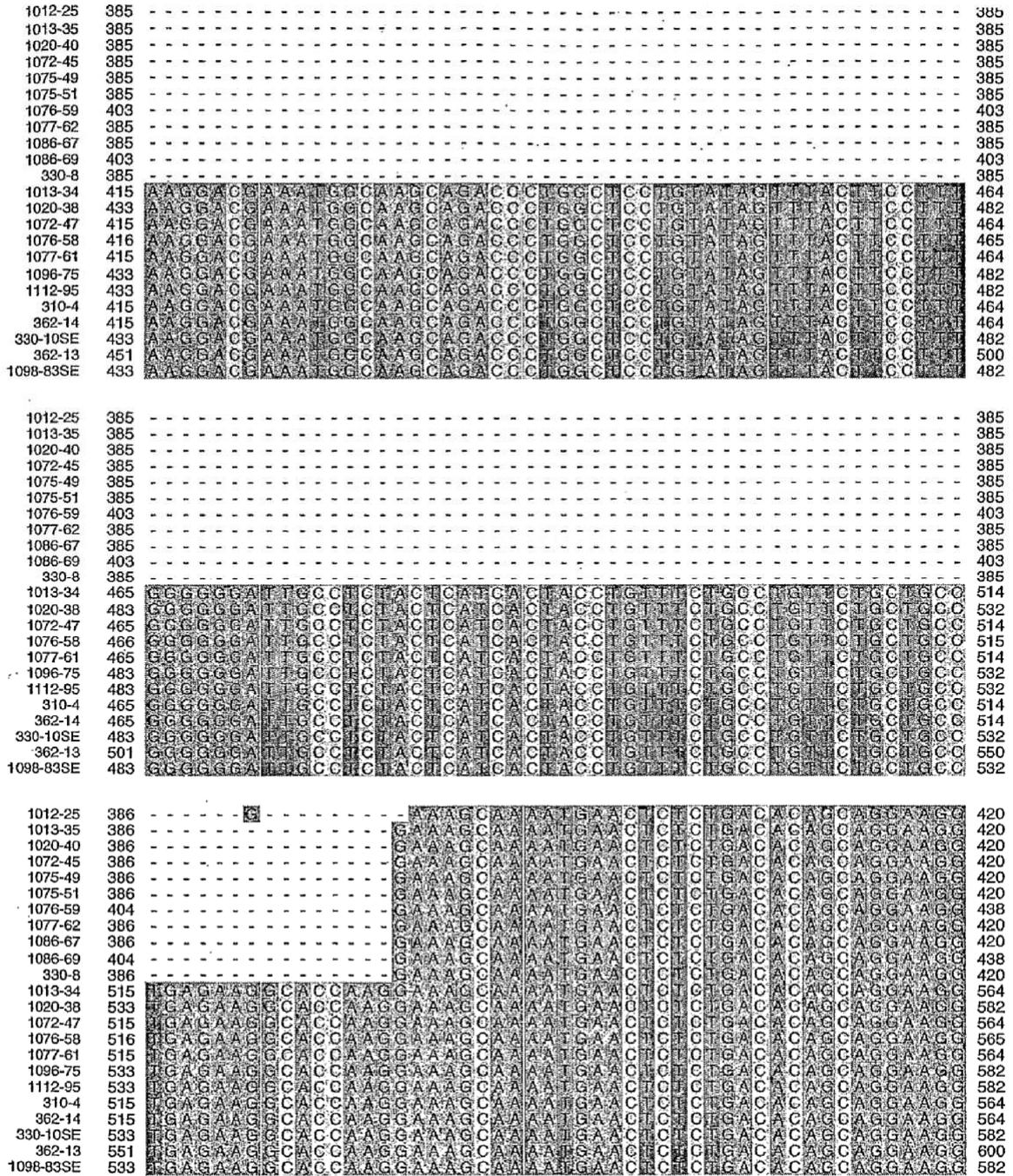


FIGURA 11F

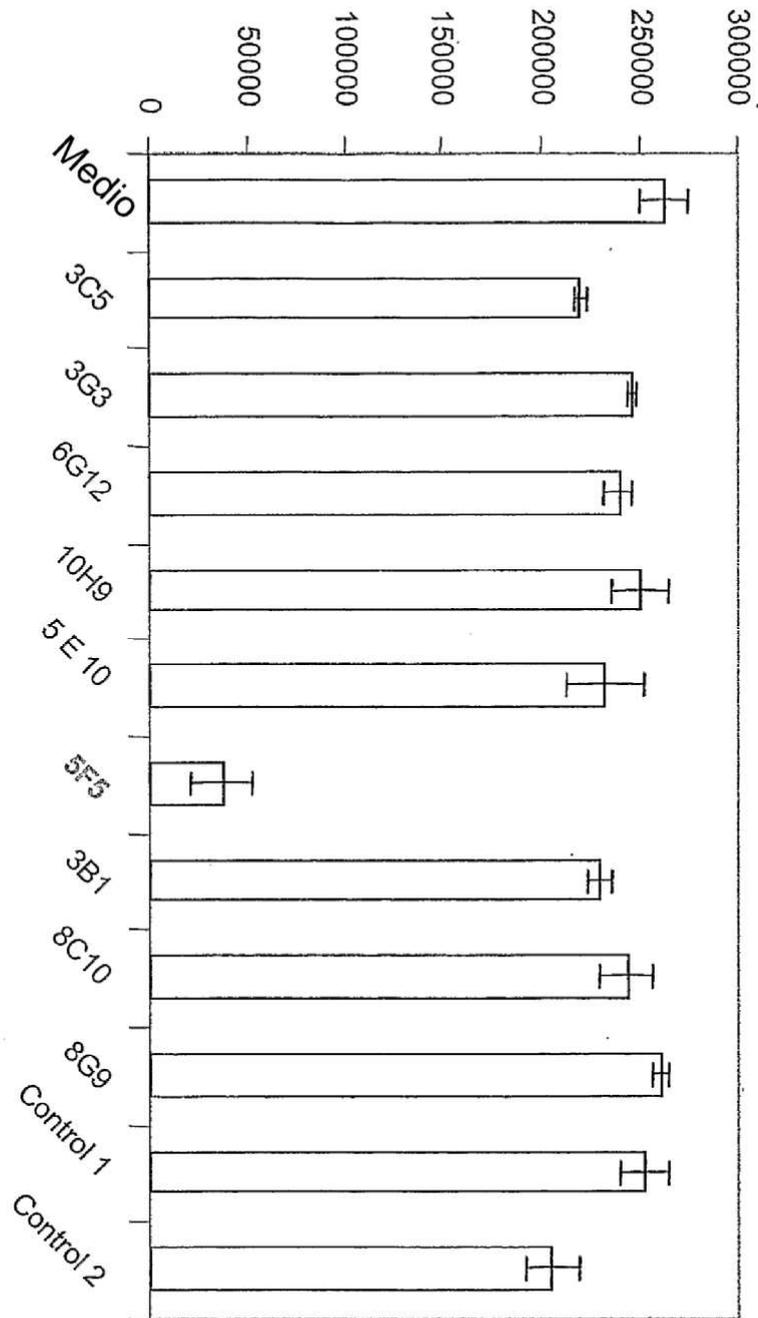
1012-25	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1013-35	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1020-40	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1072-45	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1075-49	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1075-51	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1076-59	589	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	638
1077-62	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1086-67	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1086-69	589	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	638
330-8	571	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	620
1013-34	715	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	764
1020-38	733	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	782
1072-47	715	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	764
1075-58	716	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	765
1077-61	715	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	764
1096-75	733	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	782
1112-95	733	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	782
310-4	715	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	764
362-14	715	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	764
330-10SE	733	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	782
362-13	751	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	800
1098-83SE	733	AATCCCATGCCCGGAAGGAAAAACAACCCAGGCATTGGTTAAAGCCGCCGGA	782

1012-25	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1013-35	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1020-40	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1072-45	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1075-49	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1075-51	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1076-59	639	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	688
1077-62	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1086-67	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1086-69	639	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	688
330-8	621	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	670
1013-34	765	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	814
1020-38	783	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	832
1072-47	765	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	814
1076-58	766	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	815
1077-61	765	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	814
1096-75	783	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	832
1112-95	783	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	832
310-4	765	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	814
362-14	765	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	814
330-10SE	783	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	832
362-13	801	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	850
1098-83SE	783	TCAATCGGTTCATTGGACCTGAACTCCAGAGACGGCCAGGAAATGTAAAGAAG	832

1012-25	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	699
1013-35	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1020-40	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1072-45	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1075-49	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1075-51	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1076-59	689	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	726
1077-62	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1086-67	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1086-69	689	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	726
330-8	671	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	708
1013-34	815	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	852
1020-38	833	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	870
1072-47	815	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	852
1076-58	816	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	853
1077-61	815	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	852
1096-75	833	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	870
1112-95	833	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	870
310-4	815	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	852
362-14	815	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	852
330-10SE	833	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	867
362-13	851	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	888
1098-83SE	833	CACCCAACAGAAATATGCATCCATAATGTGTGAGGAGTTAA	870

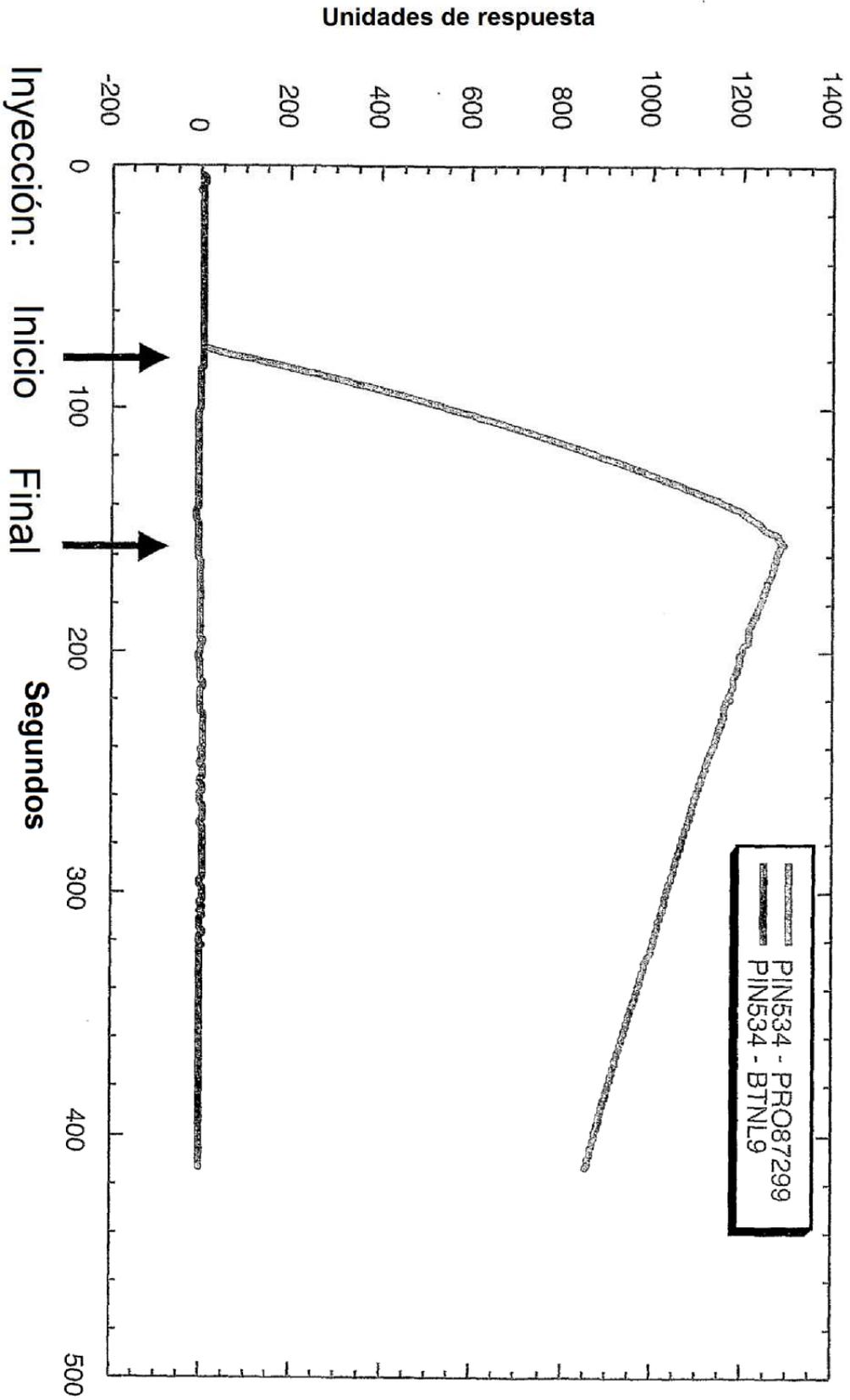
FIGURA 13

Incorporación de timidina H3



Inhibición de la proliferación inducida por anti CD3 mediante entrecruzamiento con el anticuerpo 5F5 anti PRO87299

FIGURA 14



PIN534 (HVEM) se une a PRO87299

HVEM se une a PRO87299 de forma selectiva

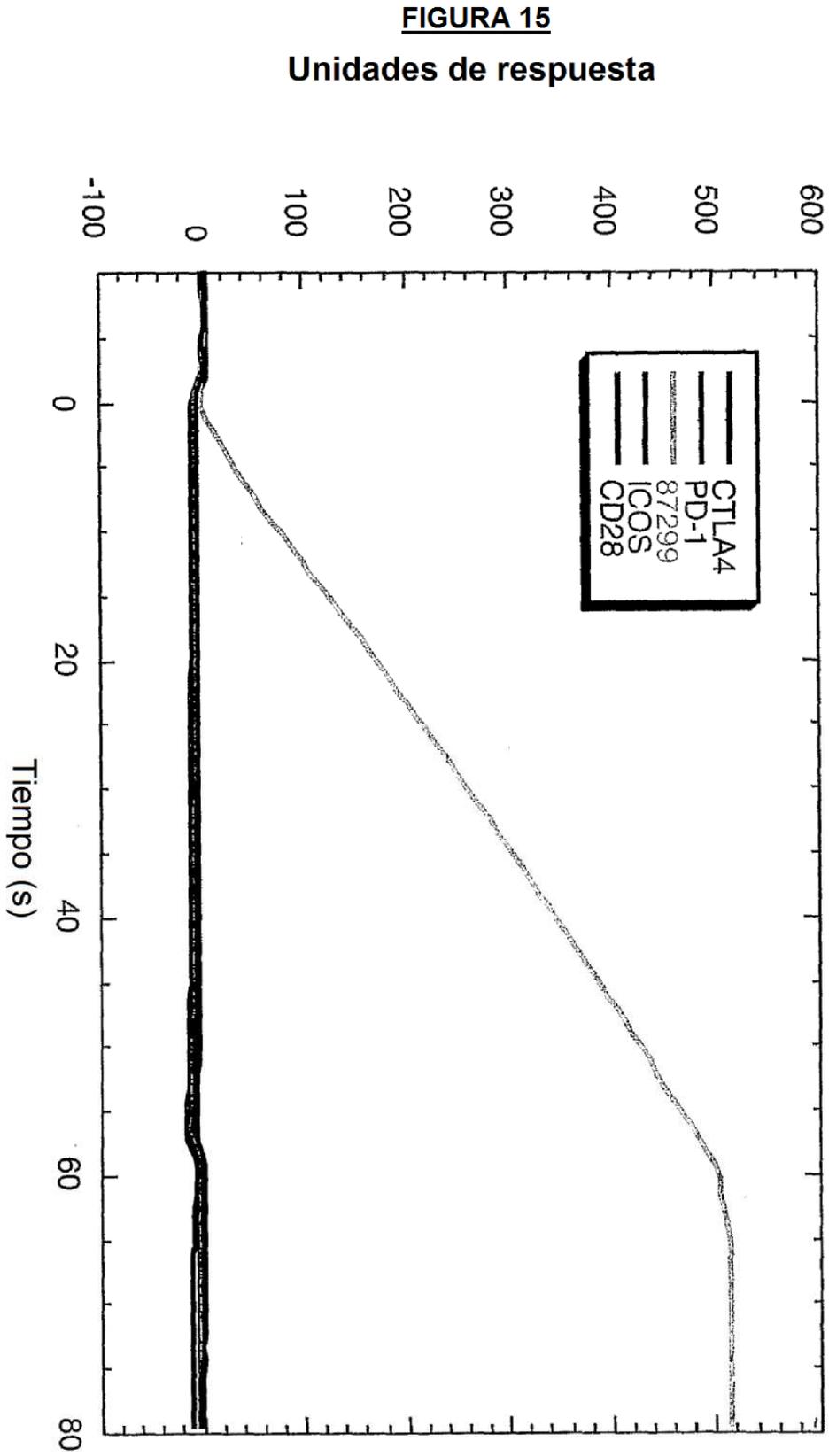
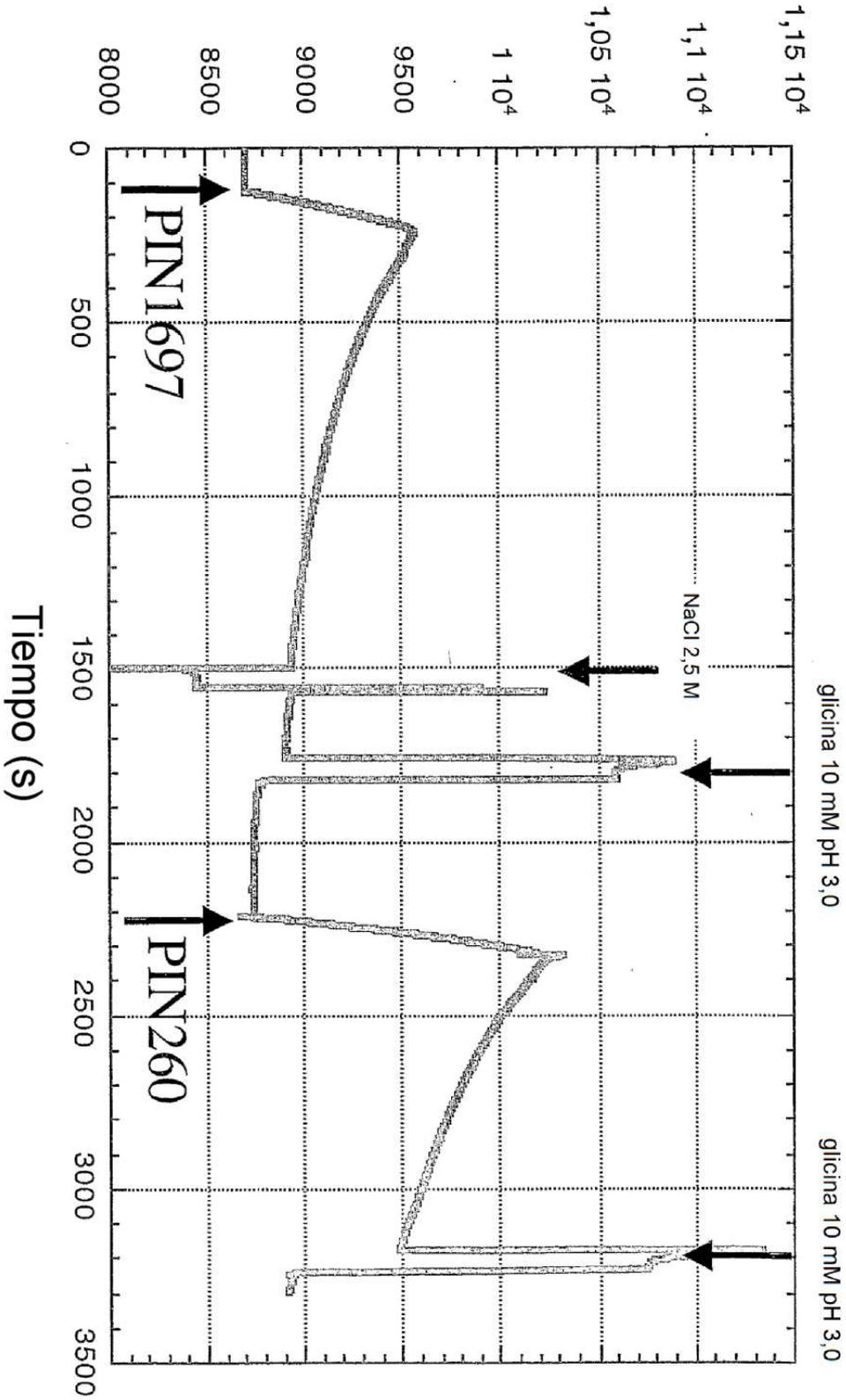


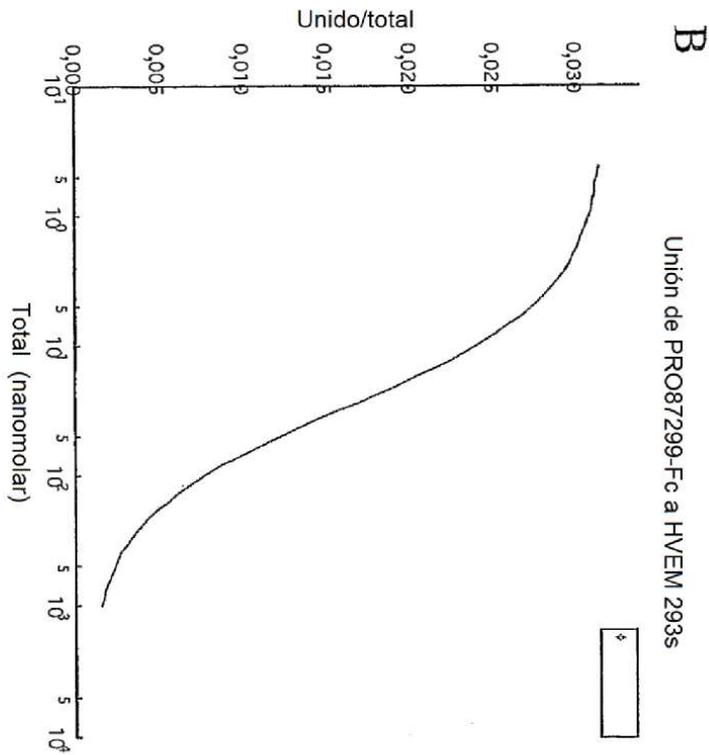
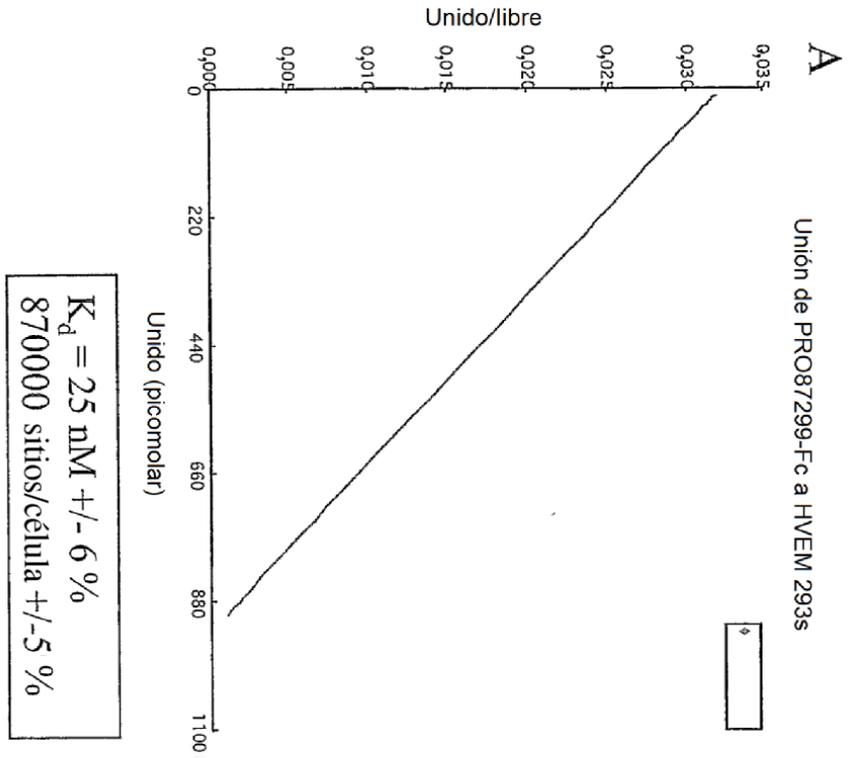
FIGURA 16

Unidades de respuesta



Dos purificaciones independientes de HVEM se unen a PRO87299
La unión es resistente a la sal, pero sensible al pH

FIGURA 17



Los anticuerpos 5E10 y 3B1 para PRO87299 bloquean la unión a HVEM
5E5 no bloquea

FIGURA 18

Unión a HVEM

Unidades de respuesta

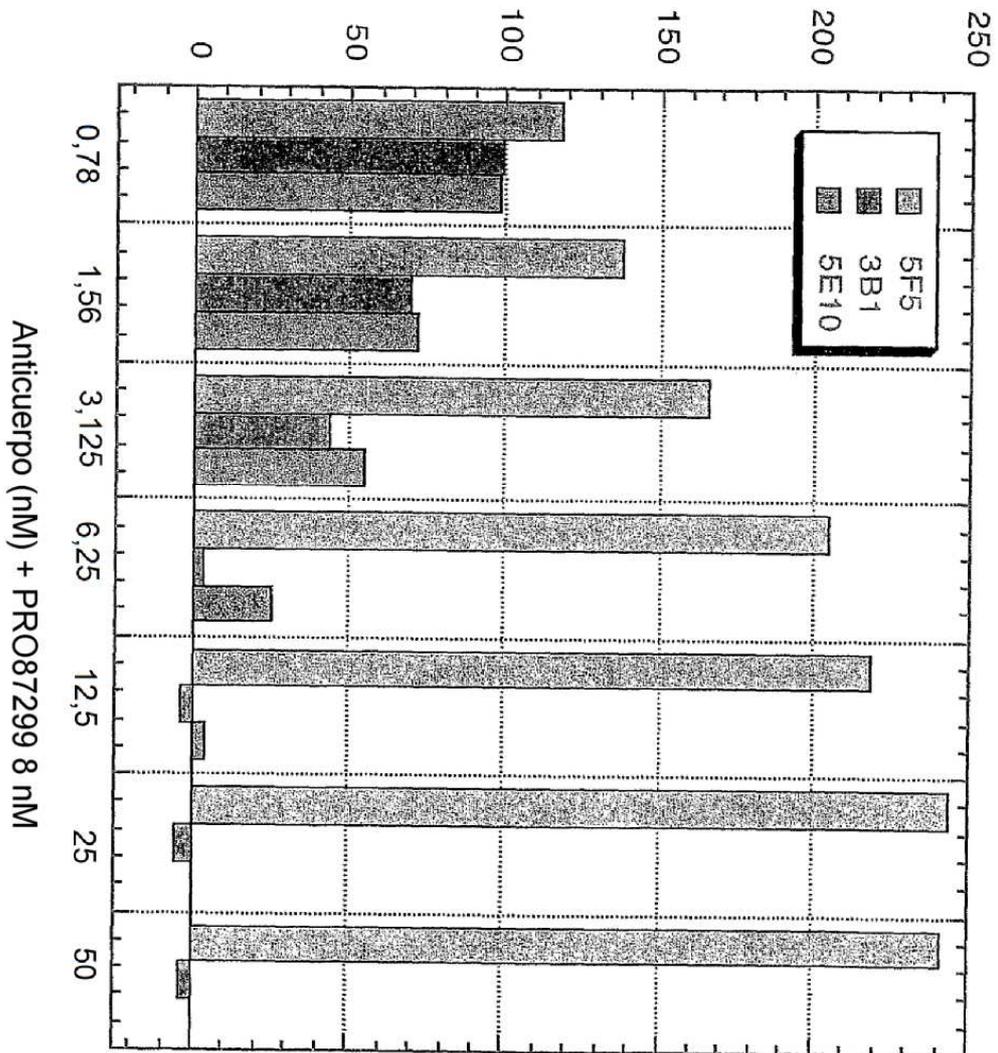
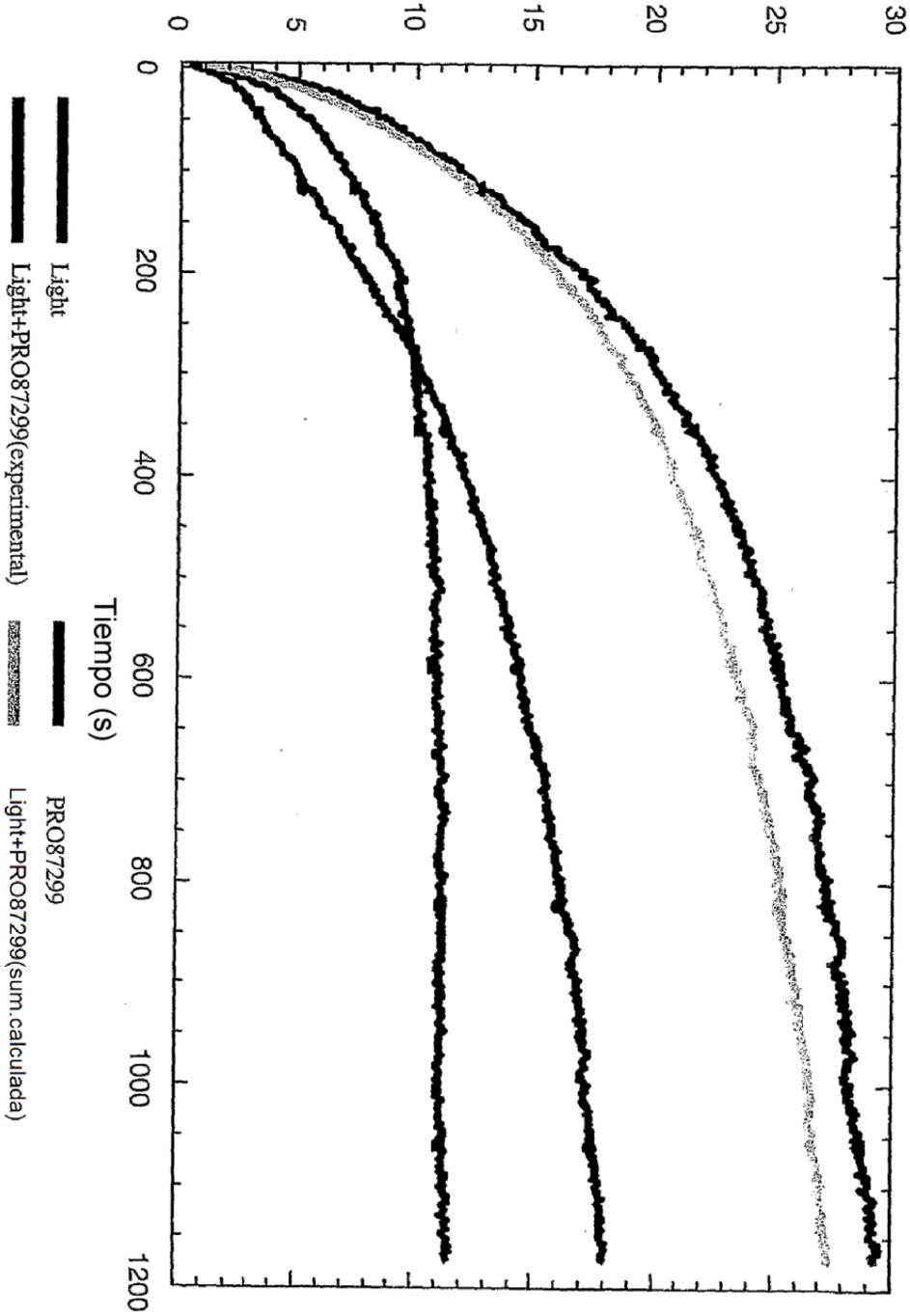


FIGURA 19

Unión a HVEM

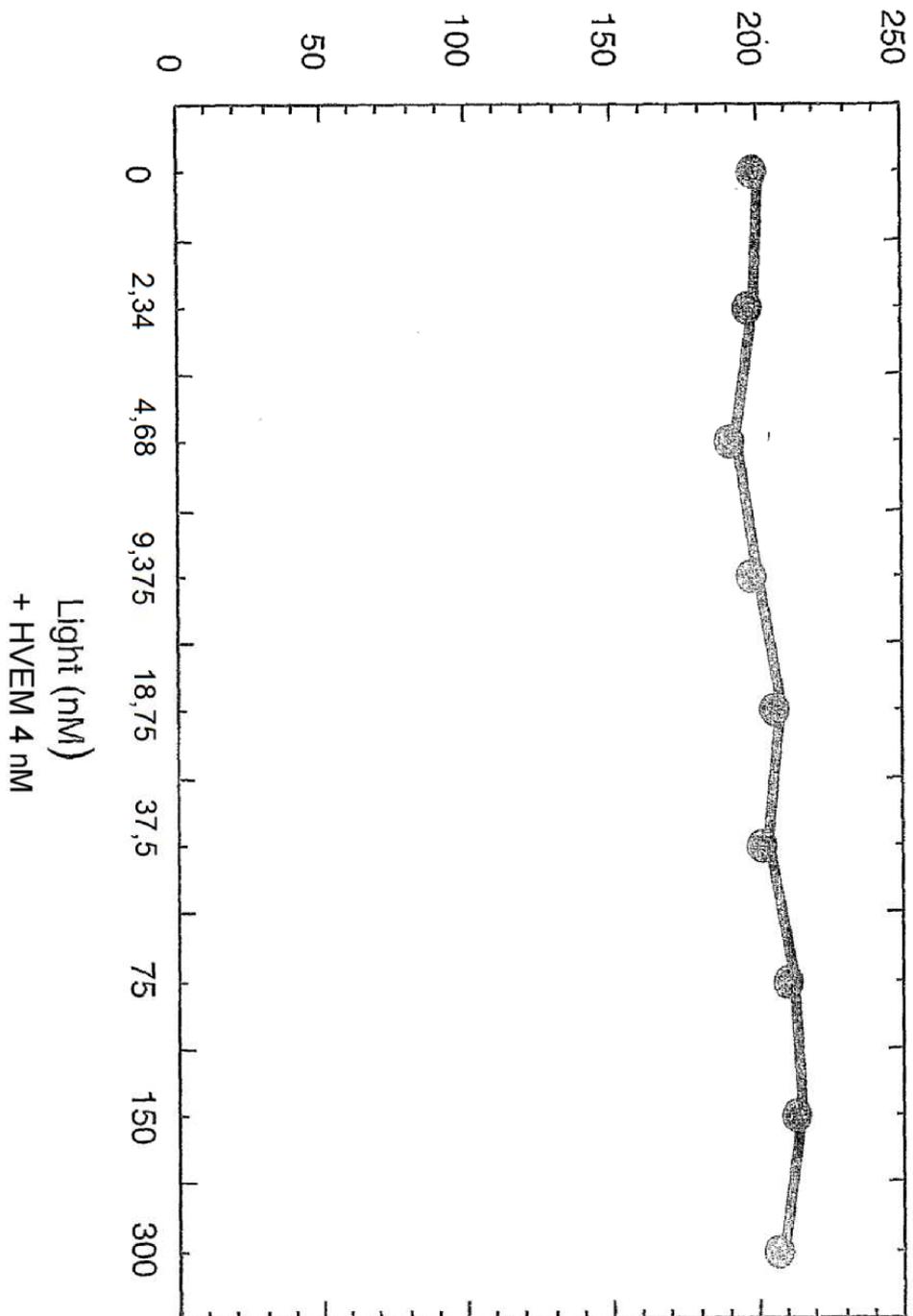
Unidades de respuesta



LIGHT y PRO87299 pueden unirse a HVEM de forma simultánea

FIGURA 20

Unión a PRO87299
Unidades de respuesta



LIGHT no bloquea la interacción PRO87299/HVEM

FIGURA 21

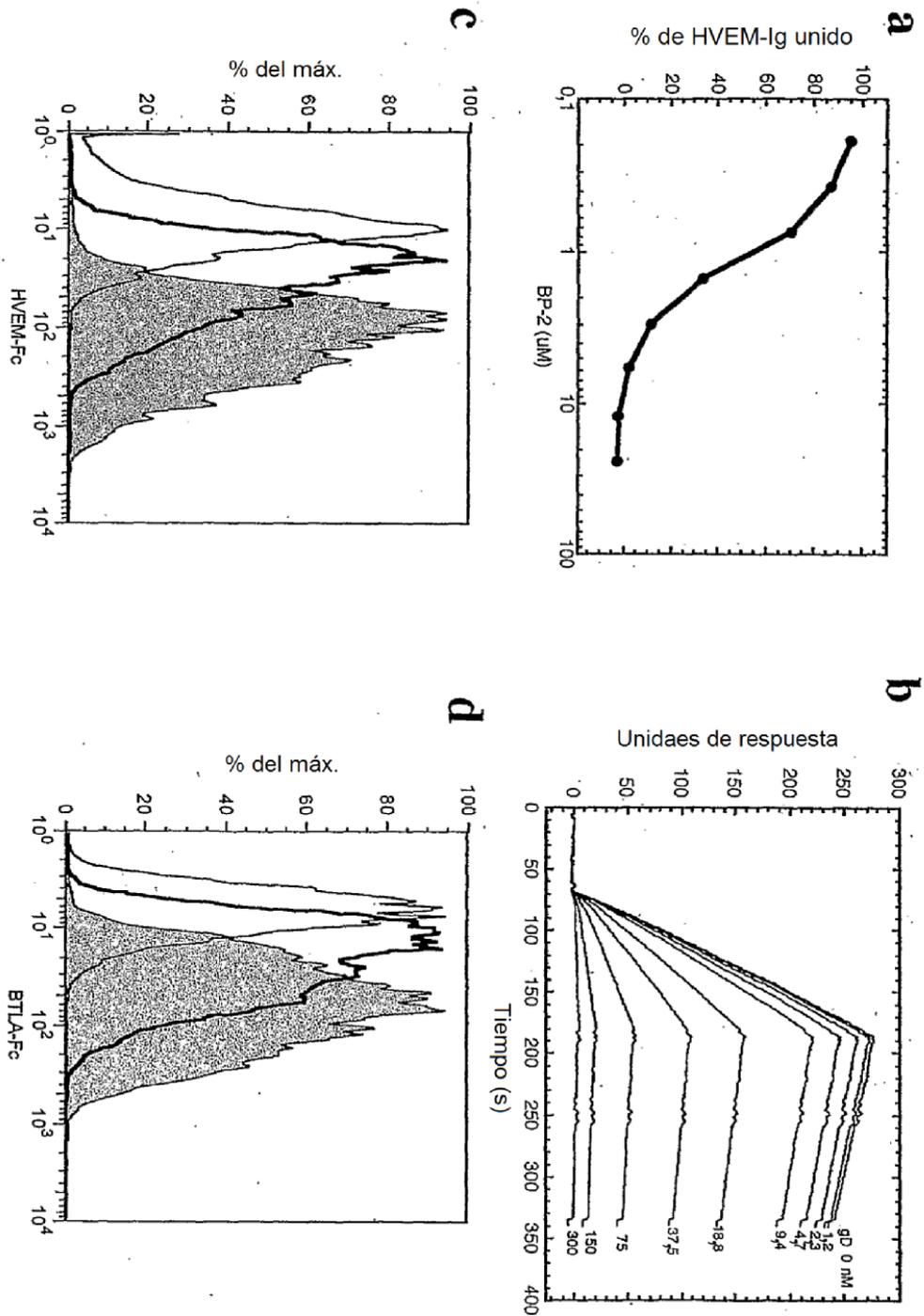
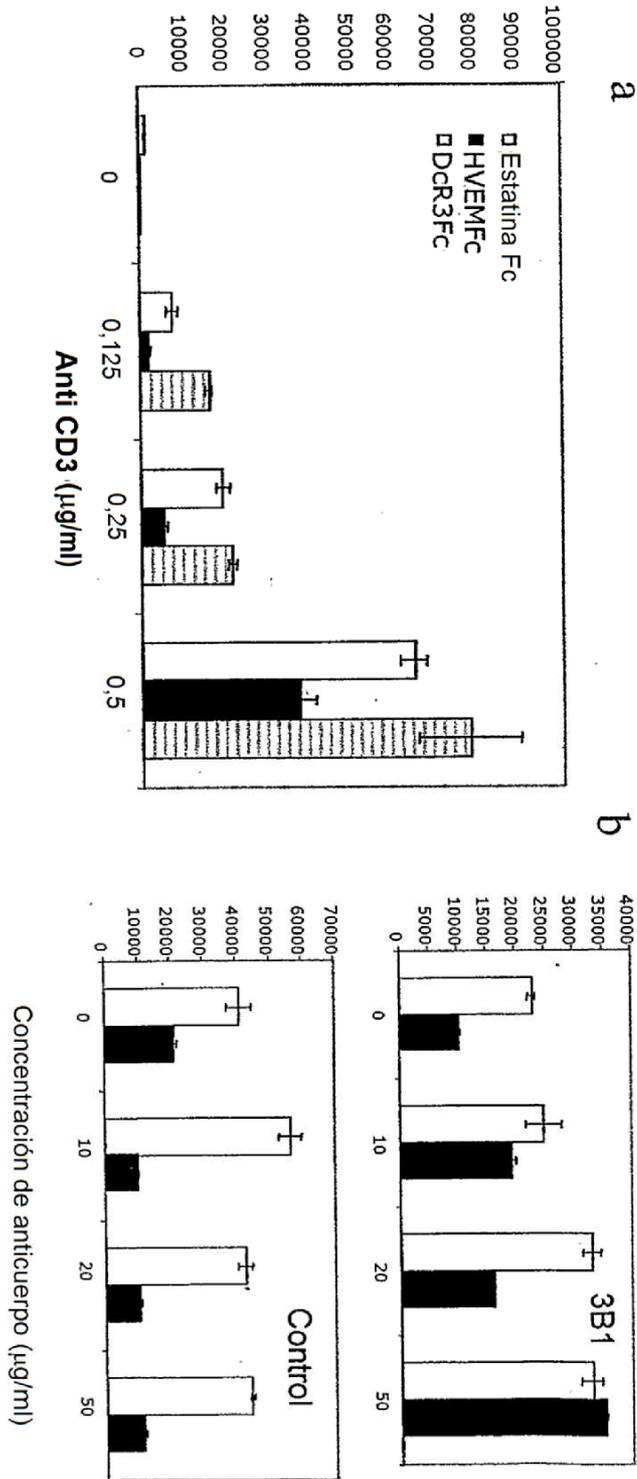


FIGURA 22

Incorporación de timidina H³



Enfermedad del injerto contra el hospedador

FIGURA 23

