

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 362**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2003 PCT/US2003/05169**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2003 WO03076569**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2003 E 03709212 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1506215**

54 Título: **Novedosos polipéptidos que tienen similitud de secuencia con GDNFR y ácidos nucleicos que los codifican**

30 Prioridad:

05.03.2002 US 361995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

GRIMALDI, CHRISTOPHER J.;
SESHAGIRI, SOMASEKAR;
STINSON, JEREMY;
WOOD, WILLIAM I. y
ZHANG, ZEMIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 616 362 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

Novedosos polipéptidos que tienen similitud de secuencia con GDNFR y ácidos nucleicos que los codifican

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en líneas generales, a la identificación y el aislamiento de un novedoso ADN y a la producción recombinante de novedosos polipéptidos que tienen similitud de secuencia con el receptor del factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía (GDNFR), denominados en este documento como polipéptidos "PRO34128".

Antecedentes de la invención

Las proteínas y los receptores unidos a membrana pueden desempeñar funciones importantes en, entre otras cosas, la formación, la diferenciación y el mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, está gobernado normalmente por la información recibida de otras células y/o por el entorno inmediato. Esta información a menudo se transmite por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que se reciben, a su vez, y se interpretan por diversos receptores celulares y por proteínas unidas a membrana. Dichas proteínas unidas a membrana y receptores celulares incluyen, aunque sin limitación, receptores de citoquinas, receptores quinasas, receptores fosfatasa, receptores implicados en interacciones entre células y moléculas de adhesión celular como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regula el crecimiento y la diferenciación celular está regulada en parte por la fosforilación de diversas proteínas celulares. Las proteínas tirosina quinasas, enzimas que catalizan ese proceso, también pueden actuar como receptores de factores de crecimiento. Los ejemplos incluyen el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y el receptor del factor de crecimiento de los nervios.

Las proteínas y las moléculas receptoras unidas a membrana tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Las inmunoadhesinas receptoras, por ejemplo, pueden emplearse como agentes terapéuticos para bloquear las interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a membrana también pueden emplearse para seleccionar inhibidores potenciales peptídicos o de molécula pequeña de la interacción relevante receptor/ligando.

La industria y el mundo académico se han esforzado en identificar nuevas proteínas receptoras o unidas a membrana nativas. Muchos esfuerzos están centrados en la selección de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de novedosas proteínas receptoras o unidas a membrana.

La presente invención es un homólogo de GDNFR. Las moléculas de GDNFR son receptores de superficie celular capaces de unirse a factores tróficos tales como factores neurotróficos derivados de la línea celular de la glía (GDNF) y neurturina. La familia de GDNFR de receptores puede ser útil en el tratamiento de trastornos neuronales tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o lesión neuronal.

En este documento se describe la identificación y caracterización de novedosos polipéptidos que tienen similitud de secuencia con GDNFR, denominados en este documento como PRO34128.

Sumario de la invención

Se ha identificado un clon de ADNc (denominado en este documento ADN 194917-3044) que tiene homología con el ácido nucleico que codifica GDNFR y que codifica un novedoso polipéptido, denominado en la presente solicitud como "PRO34128".

En una realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO34128 como se define en las reivindicaciones.

La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos

- aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
5 aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
10 aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que codifica
un polipéptido PRO34128, que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en este
documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se describe en este documento, un
dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se describe en este
documento o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud
completa como se describe en este documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).
- 15 La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos
aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
20 aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
25 aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
30 aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
35 aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que
comprende la secuencia codificante de ADNc del polipéptido PRO34128 de longitud completa como se describe en
este documento, la secuencia codificante del polipéptido PRO34128 que carece del péptido señal como se describe
en este documento, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido PRO34128
40 transmembrana con o sin el péptido señal, como se describe en este documento o la secuencia codificante de
cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se
describe en este documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).
- La molécula de ácido nucleico aislada puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos
45 aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
50 aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
55 aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
60 aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que codifica el
65 mismo polipéptido maduro codificado por el ADNc de proteína humana depositado en la ATCC como se describe en
este documento o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Otro aspecto de la molécula proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO34128 que tiene el dominio transmembrana delecionado o el dominio transmembrana inactivado, o es complementario a dicha secuencia de nucleótidos codificante, donde el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido se describen en este documento. Por lo tanto, se contemplan los dominios extracelulares solubles del polipéptido PRO34128 descrito en este documento.

También se describen fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido PRO34128 o el complemento del mismo, que puede encontrar uso como, por ejemplo, sondas de hibridación o para fragmentos codificantes de un polipéptido PRO34128 que puede codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti- PRO34128 o como sondas oligonucleotídicas antisentido. Dichos fragmentos de ácido nucleico habitualmente son de al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 110 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 130 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 140 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 170 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 190 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 550 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 650 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 750 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 850 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 950 nucleótidos de longitud y como alternativa de al menos aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, donde en el contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos el 10 % de esa longitud de referencia. Se aprecia que los novedosos fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO34128 puede determinarse de un modo rutinario alineando la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO34128 con otras secuencias conocidas de nucleótidos usando cualquiera de varios programas bien conocidos de alineación de secuencia y determinando que el fragmento o fragmentos de secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO34128 son novedosos. Todas estas secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO34128 se contemplan en este documento. También se contemplan los fragmentos polipeptídicos de PRO34128 codificados por estos fragmentos de molécula de nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos del polipéptido PRO34128 que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO34128.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido PRO34128 aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas identificadas anteriormente en este documento como se define en las reivindicaciones.

Un polipéptido PRO34128 aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente

un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO34128 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en este documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal como se describe en este documento, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, como se describe en este documento o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en este documento.

Un polipéptido PRO34128 aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados en la ATCC como se describe en este documento.

También se describe un polipéptido PRO34128 aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de inicio y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos como se describe anteriormente en este documento. Los procesos para producir los mismos también se describe en este documento, donde esos 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 PRO34128 y recuperar el polipéptido PRO34128 del cultivo celular.

También se describe un polipéptido PRO34128 aislado que tiene el dominio transmembrana delecionado o el dominio transmembrana inactivado. Los procesos para producir los mismos también se describen en este documento, donde esos 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 PRO34128 y recuperar el polipéptido PRO34128 del cultivo celular.

En otra realización más, la invención se refiere a agonistas y a antagonistas de un polipéptido PRO34128 nativo como se define en este documento como se define en las reivindicaciones. En una realización, el agonista o el antagonista es un anticuerpo anti-PRO34128.

También se describe en este documento un método de identificación de agonistas o de antagonistas para un polipéptido PRO34128 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO34128 con una molécula candidata y controlar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO34128. Preferiblemente, el polipéptido PRO34128 es un polipéptido PRO34128 nativo.

En una realización adicional más, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido PRO34128, o un agonista o un antagonista de un polipéptido PRO34128 como se describe en este documento, o un anticuerpo PRO34128, en combinación con un vehículo como se define en las reivindicaciones. El vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en este documento el uso de un polipéptido PRO34128, o un agonista o un antagonista del mismo como se describe anteriormente en este documento, o un anticuerpo anti-PRO34128, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al polipéptido PRO34128, un agonista o un antagonista del mismo o un anticuerpo anti-PRO34128.

En otras realizaciones de la presente invención, como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento. También se proporciona la célula hospedadora que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, *E. coli* o de levadura. Un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento se proporciona adicionalmente y comprende cultivar las células

hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

- 5 En otras realizaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento fusionado a un polipéptido o una secuencia de aminoácidos heteróloga como se define en las reivindicaciones. Ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento fusionado a una secuencia de marca epitópica de una región Fc de una inmunoglobulina.
- 10 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o a continuación como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.
- 15 También se describen en este documento sondas oligonucleotídicas que pueden ser útiles para aislar secuencias de nucleótidos genómicas de o de ADNc, para medir o detectar la expresión de un gen asociado o como sondas antisentido, donde esas sondas pueden obtenerse de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente o a continuación. Las longitudes preferidas de sonda se describen anteriormente.
- 20 También se describen en este documento métodos de uso de los polipéptidos PRO de la presente invención para diversos usos basándose en los datos de ensayo biológico funcional presentados en los Ejemplos a continuación.

25 Una molécula de ácido nucleico aislada de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO34128 que tiene el dominio transmembrana delecionado o el dominio transmembrana inactivado, o es complementario a dicha secuencia de nucleótidos codificante, donde el dominio transmembrana se ha identificado de forma provisional como extendiéndose desde aproximadamente la posición de aminoácido 352 hasta aproximadamente la posición de aminoácido 372 en la secuencia de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, se contemplan dominios extracelulares solubles de los polipéptidos PRO34128 descritos en este documento.

- 30 También se describe en este documento una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
- 35 aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
- 40 aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
- 45 aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
- 50 aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos
- aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos
- aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una molécula de ADN que codifica los aminoácidos 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido de 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

55 Un polipéptido PRO34128 aislado de la invención puede tener el dominio transmembrana delecionado o el dominio transmembrana inactivado. Los procesos para producir los mismos también se describen en este documento, donde esos 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 PRO34128 y recuperar el polipéptido PRO34128 del cultivo celular.

- 60 También se describe en este documento un polipéptido PRO34128 soluble aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos
- 65 aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de

secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido de 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). En un aspecto preferido, el polipéptido PRO34128 soluble aislado comprende los aminoácidos 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido de 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

También se describe en este documento un polipéptido PRO34128 aislado, que comprende la secuencia de los restos de aminoácido de aproximadamente 1 a aproximadamente 394, incluidos, de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), o un fragmento del mismo que es biológicamente activo o suficiente para proporcionar un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO34128, donde la identificación de los fragmentos del polipéptido PRO34128 que poseen actividad biológica o proporcionan un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO34128 puede conseguirse de un modo rutinario usando técnicas que con bien conocidas en la técnica. Preferiblemente, el fragmento PRO34128 retiene una actividad biológica cualitativa de un polipéptido PRO34128 nativo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un ADNc que contiene una secuencia de nucleótidos (nucleótidos 88-1269) que codifica la secuencia nativa PRO34128, donde la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) es un clon denominado en este documento como "ADN194917-3044". También se presenta en **negrita y subrayado** las posiciones de los codones respectivos de inicio y de parada.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de un polipéptido PRO34128 de secuencia nativa derivado de la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1. También se muestran las localizaciones aproximadas de otros diversos dominios polipeptídicos importantes.

La Figura 3A-B muestra el patrón de expresión del ADN194917-3044 en tejidos adultos y fetales.

La Figura 4A-D demuestra que PRO34128 se expresa sobre la superficie celular por expresión de una construcción marcada con flag, y la posterior detección con un anticuerpo anti-flag.

La Figura 5A-D muestra la interacción de PRO34128 con RET.

La Figura 6A-D muestra PRO34128 y sus propiedades de unión a ligando.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

Las expresiones "polipéptido PRO34128", "proteína PRO34128" y "PRO34128" cuando se usan en este documento abarcan PRO34128 de secuencia nativa y variantes del polipéptido PRO34128 (que se definen adicionalmente en este documento). El polipéptido PRO34128 puede aislarse de diversas fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o se pueden preparar por métodos recombinantes y/o sintéticos.

Un "PRO34128 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un PRO34128 derivado de la naturaleza. Dicho PRO34128 de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes y/o sintéticos. La expresión "PRO34128 de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas de origen natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas con corte y empalme alternativo) y variantes alélicas de origen natural de PRO34128. En diversas realizaciones de la invención, el PRO34128 de secuencia nativa es un PRO34128 de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 394 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Sin embargo, aunque el polipéptido PRO34128 descrito en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) se muestra comenzando con el resto de metionina denominado en este documento como la posición de aminoácido 1, es concebible y posible que otro resto de metionina localizado cadena arriba o cadena abajo de la posición de aminoácido 1 en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) puede emplearse como resto de aminoácido de partida para el polipéptido PRO34128.

El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido PRO34128 se refiere a una forma del polipéptido PRO34128 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático. Habitualmente, un ECD del polipéptido PRO34128 tendrá menos de aproximadamente el 1 % de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y, preferiblemente, tendrá menos de aproximadamente el 0,5 % de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio o dominios transmembrana identificados para los polipéptidos PRO34128 de la presente invención se

identifican conforme a los criterios empleados de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada extremo del dominio identificado inicialmente. Por tanto, en una realización de la presente invención, el dominio extracelular de un polipéptido PRO34128 que comprende los aminoácidos 1 a X, donde X es cualquier aminoácido de los aminoácidos 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, se contemplan por la presente invención.

La localización aproximada de los "péptidos señal" de los diversos polipéptidos PRO34128 descritos en este documento se muestra en la presente memoria descriptiva y/o en las figuras adjuntas. Se aprecia, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada lado del límite C-terminal del péptido señal identificado inicialmente en este documento, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse conforme a los criterios empleados de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal desde un polipéptido secretado no es completamente uniforme, produciendo más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se escinde en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada lado del límite C-terminal del péptido señal identificado en este documento, y los polinucleótidos que los codifican, se contemplan por la presente invención.

"Polipéptido variante PRO34128" significa un polipéptido PRO34128 activo como se define a continuación que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de (a) los restos 1 a 394 del polipéptido PRO34128 mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), (b) 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido del aminoácido 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (c) otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Dichos polipéptidos variantes PRO34128 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO34128 donde uno o más restos de aminoácido están añadidos, o delecionados, en extremo N- y/o C-terminal, así como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Normalmente, un polipéptido variante PRO34128 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con (a) los restos 1 a 394 del polipéptido PRO34128 mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), (b) 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido del aminoácido 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (c) otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Los polipéptidos variantes PRO34128 no abarcan la secuencia del polipéptido PRO34128 nativo. Normalmente, los polipéptidos variantes PRO34128 son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a secuencias del polipéptido PRO34128 identificadas en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en una secuencia de PRO34128, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinación de un porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversos modos que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al

público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de este documento, sin embargo, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen como se describe a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. La autoría del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado en U.S. Copyright Registration con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede recopilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los propósitos de este documento, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia dada de aminoácidos A respecto a, con o frente a una secuencia dada de aminoácidos B (que puede redactarse como alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de restos de aminoácidos valorada como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencia de aminoácidos, las Tablas 2-5 demuestran el modo de calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos denominada "PRO", donde "PRO" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO hipotético de interés, "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente a la que se está comparando el polipéptido de interés "PRO", y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes restos de aminoácido hipotéticos.

Salvo que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en este documento se obtienen como se describe anteriormente usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de secuencia de aminoácidos también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de otro modo del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, donde todos esos parámetros de búsqueda se configuran a los valores por defecto incluyendo, por ejemplo, exponer = sí, hebra = todo, apariciones esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor-e multietapa = 0,01, constante para multietapa = 25, disminución para alineación con huecos final = 25 y matriz de valores = BLOSUM62.

En situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia dada de aminoácidos A respecto a, con o frente a una secuencia dada de aminoácidos B (que puede redactarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con o frente a una secuencia dada de aminoácidos B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de restos de aminoácidos valorada como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es la cantidad total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

"Polinucleótido variante PRO34128" o "secuencia de ácido nucleico variante PRO34128" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO34128 activo como se define a continuación y que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica los restos 1 a 394 del polipéptido PRO34128 mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido del aminoácido 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

Normalmente, un polinucleótido variante PRO34128 tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica los restos 1 a 394 del polipéptido PRO34128 mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica los aminoácidos 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido del aminoácido 347-377 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) o (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica otro fragmento específicamente derivado de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Las variantes del polinucleótido PRO34128 no abarcan la secuencia de nucleótidos de PRO34128 nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes PRO34128 son de al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, como alternativa de al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido PRO34128 identificadas en este documento se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO34128, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinación de un porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico puede conseguirse de diversos modos que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los propósitos de este documento, sin embargo, los valores de porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico se obtienen como se describe a continuación usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. La autoría del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, donde está registrado en U.S. Copyright Registration con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede recopilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debe recopilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los propósitos de este documento, el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia dada de ácido nucleico C respecto a, con, frente a una secuencia dada de ácido nucleico D (que puede redactarse como alternativa como una secuencia de ácido nucleico dada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico dada B) se calcula del siguiente modo:

100 veces la fracción W/Z

donde W es la cantidad de nucleótidos valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de C y D, y donde Z es la cantidad 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, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D respecto a C. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencia de aminoácidos, las Figuras 3C-D demuestran el modo de calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico denominada "ADN de comparación" con la secuencia de ácido nucleico denominada "ADN PRO", donde "ADN PRO" representa una secuencia de ácido nucleico codificante de PRO hipotética de interés, "ADN de comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que la molécula de ácido nucleico "ADN PRO" de interés se está comparando, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

Salvo que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados en este documento se obtienen como se describe anteriormente usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de otro modo del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, donde todos esos parámetros de búsqueda se configuran a los valores por defecto incluyendo, por ejemplo, exponer = sí, hebra = todo, apariciones esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor-e multietapa = 0,01, constante para multietapa = 25, disminución para alineación con huecos final = 25 y matriz de valores = BLOSUM62.

En situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencia, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia dada de ácido nucleico C respecto a, con o frente a una secuencia dada de ácido nucleico D (que puede redactarse como alternativa como una secuencia de ácido nucleico dada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico respecto a, con o frente a una secuencia dada de ácido nucleico D) se calcula del siguiente modo:

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

donde W es la cantidad de nucleótidos valorados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en esa alineación del programa de C y D, y donde Z es la cantidad 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, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D respecto a C.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes PRO34128 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO34128 activo y que son capaces de hibridar, preferiblemente en condiciones de hibridación y lavado rigurosas, con secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO34128 de longitud completa mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2). Los polipéptidos variantes PRO34128 pueden ser aquellos que están codificados por un polinucleótido variante PRO34128.

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en este documento, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los componentes con los que está asociado de forma natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían normalmente con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna por el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de PRO34128 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO34128 u otro ácido nucleico que codifica polipéptido "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica PRO34128. Preferiblemente, en ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes con los que está asociado de forma natural. Una molécula de ácido nucleico que codifica PRO34128 aislada es diferente en la forma o en la configuración en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica PRO34128 como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido PRO34128 incluye moléculas de ácido nucleico que codifican PRO34128 contenidas en células que normalmente expresan PRO34128 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

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

Un ácido nucleico está "unido de forma funcional" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o para un líder de secreción está unido de forma funcional a ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma funcional a una secuencia codificante si está posicionado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por ligamiento en sitios convenientes de restricción. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales anti-PRO34128 (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpo anti-PRO34128 con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO34128 de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos anti-PRO34128 (véase a continuación). La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, de la temperatura de lavado y de la concentración salina. En general, sondas más largas requieren temperaturas mayores para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado de re-hibridar cuando están presentes hebras complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderán a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas inferiores menos rigurosas. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase, Ausubel *et al*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

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

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

La expresión "epítipo marcado" cuando se usa en este documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO34128 fusionado a un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual puede prepararse un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de modo que no interfiera con la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido marcador preferiblemente también es bastante único de modo que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácido y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácido (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácido).

Como se usa en este documento, el término "inmunoadhesina" denomina moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente al reconocimiento de antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

"Activo" o "actividad" para los propósitos de este documento se refiere a una o más formas de PRO34128 que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de PRO34128 nativo o de origen natural, donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por un PRO34128 nativo o de origen natural diferente a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un PRO34128 nativo o de origen natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un PRO34128 nativo o de origen natural.

El factor neurotrófico derivado de la línea celular de la glía (GDNF), potencia la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, neuronas motoras y neuronas sensoriales. Una señal de GDNF se transduce por unión a un receptor de GDNF (GDNFR), una molécula accesoria RET. La ruta de transducción de señales de GDNFR es la más potente entre las rutas neurotróficas conocidas en la prevención de degeneración inducida por axotomía de neuronas motoras, y también actúa sobre neuronas sensoriales, pero a un grado menor. La ruta de GDNFR es una diana terapéutica para el alivio de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), de la enfermedad de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee de forma parcial o completa, inhiba o neutralice una actividad biológica de un polipéptido PRO34128 nativo descrito en este documento. De un modo similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido PRO34128 nativo descrito en este documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos PRO34128 nativos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO34128 pueden comprender poner en contacto un polipéptido PRO34128 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido PRO34128.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o el trastorno patológico diana. Los que necesitan tratamiento los que ya tienen el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que tiene que prevenirse el trastorno.

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

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de competición o de compañía, tales como perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

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

"Vehículos", como se usa en este documento, incluye vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero que está expuesto a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

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

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

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH I) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en este documento para Fab' en que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes albergan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cistinas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen 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 de cadena sencilla" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que el sFV forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de 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 pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH - VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente 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 de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y mucho más preferiblemente, 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 por el uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une a ese polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

La palabra "marcador" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopo o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas englobadas en este documento incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas concretas, tales como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 4.275.149.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un polipéptido PRO34128 o anticuerpo contra el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" se define en este documento teniendo un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido descrito en este documento o un agonista o antagonista del mismo es una cantidad suficiente para realizar un propósito específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse de forma empírica y de una manera rutinaria, en relación al propósito indicado.

Tabla 1

```
/*
*
* incremento C-C desde 12 a 15
* Z es el promedio de EQ
* B es el promedio de ND
* coincidir con parada es _M; parada-parada = 0; J (comodín) coincidente = 0
*/
#define _M -8 /* valor de una coincidencia con una parada */

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 },
/* 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, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _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 }
};
```

Tabla 1 (cont.)

```

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

#define MAXJMP 16      /* saltos máx en un diag */
#define MAXGAP 24     /* no continuar para penalizar huecos mayores que este */
#define JMPS 1024     /* saltos máx en una vía */
#define MX 4          /* guardar si existe al menos MX-1 bases desde el último salto */

#define DMAT 3        /* valor de bases apareadas */
#define DMIS 0        /* penalización para bases desapareadas */
#define DINSO 8       /* penalización para un hueco */
#define DINSI 1       /* penalización por base */
#define PINSO 8       /* penalización para un hueco */
#define PINSI 4       /* penalización por resto */

struct jmp {
    short      N[MAXJMP];      /* tamaño de salto (neg para del y) */
    unsigned short X[MAXJMP]; /* n.º de bases de saltos en seq x */
};

struct diag {
    int      score;      /* valoración en el último salto */
    long     offset;     /* compensación de bloque prev */
    short    jmp;        /* índice salto actual */
    struct jmp jp;       /* lista de saltos */
};

struct path {
    int      spc;          /* cantidad de espacios destacados */
    short    n[JMPS];     /* tamaño de salto (hueco) */
    int      x[JMPS];     /* loc de salto (último elemento antes de hueco) */
};

char      *ofile;          /* nombre de archivo de salida */
char      *namex[2];      /* nombres de sec: getseqs() */
char      *prog;          /* nombre prog para msgs err */
char      *seqx[2];       /* secs: getseqs() */
int      dmax;            /* mejor diag: nw() */
int      dmax0;           /* diag final */
int      dna;             /* ajustar si ADN: principal() */
int      endgaps;         /* ajustar si penalizan huecos finales */
int      gapx, gapy;      /* huecos totales en secs */
int      lcn0, len1;      /* sec lens */
int      ngapx, ngapy;    /* tamaño total de huecos */
int      smax;            /* valoración máx: nx() */
int      *xbm;            /* mapa de bits para coincidencias */
long     offset;          /* compensación actual en archivo jmp */
struct    diag *dx;       /* diagonales holds */
struct    path pp[2];     /* retiene vía por secs */

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

/* programa de alineación Needleman-Wunsch
*
* uso: prog archivo 1 archivo 2
* cuando archivo 1 y archivo 2 son dos ADN o dos secuencias de proteína.
* Las secuencias pueden estar en mayúsculas o en minúsculas y pueden contener ambigüedades
* Se ignora cualquier línea que empiece con ';', '>' o '<'
* La longitud máxima de archivo es 65535 (limitada por x sin firma corto en la estructura jmp)
* Una secuencia con 1/3 o más de sus elementos ACGTU se asume que es ADN
* Los resultados están en el archivo "align.out"
*
* El programa podría crear un archivo tmp en /tmp para guardar información acerca del rastreo.
* Versión original desarrollada en BSD4.3 sobre una 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, "uso: % archivo 1 archivo2\n", prog);
        fprintf(stderr, "cuando archivo 1 y archivo 2 son dos ADN o dos secuencias de proteína\n");
        fprintf(stderr, "Las secuencias pueden estar en mayúsculas o en minúsculas\n");
        fprintf(stderr, "Se ignora cualquier línea que empiece con ';', '>' o '<'\n");
        fprintf(stderr, "Los resultados están en el archivo \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    scqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    scqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;
    ofile = "align.out";
    /* 1 para penalizar huecos finales */
    /* archivo de salida */

    nw();
    readjumps();
    print();
    /* rellenar la matriz, obtener los jmps posibles */
    /* obtener los jmps actuales */
    /* imprimir estadísticas, alineación */

    cleanup();
    /* desvincular cualquier archivo tmp */
}

```

Tabla 1 (cont.)

/* hacer la alineación, reenviar mejor valor; principal()
 * ADN: valores en Fitch y Smeith, PNAS, 80, 1382-1386. 1983
 * pro: valores PAM 250
 * Cuando los valores son iguales, se prefieren desapareamientos para cualquier hueco, preferiblemente
 * un hueco nuevo para extender un hueco existente, y preferiblemente un hueco en sec x
 * para un hueco en sec y.
 */

```

    nw
{
    char      *px, *py;          /* sec s y ptr s */
    int       *ndely, *dely      /* controlar del y */
    int       ndelx, delx;       /* controlar de lx */
    int       *tmp;              /* para permutar fila0, fila1 */
    int       mis;               /* valor para cada tipo */
    int       ins0, ins1; /* penalizaciones de inserción */
    register  id;                /* índice diagonal */
    register  ij;                /* índice jmp */
    register  *col0, *col1;      /* valor para actual, última fila */
    register  xx, yy;            /* índice en sec s */

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

    ndely = (int*)g_calloc("para obtener ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int*)g_calloc("para obtener dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int*)g_calloc("para obtener col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int*)g_calloc("para obtener col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (ADN)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (ADN)? 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;

    /* rellenar matriz coincidente
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* iniciar el primer registro en 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;
        }
    }
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

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'"];

    /* actualizar penalización para del en sec x;
     * favorecer nueva del sobre del existente
     * ignorar MAXGAP si se ponderan huecos finales
     */
    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]++;
    }
}

/* actualizar penalización para del en sec y;
 * favorecer nueva del sobre del existente
 */
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++;
}

/* seleccionar el valor máximo; cuando es favorable
 * mis sobre cualquier del y del x sobre del y
 */

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 *
 * imprimir() -- solo rutina visible fuera de este módulo
 *
 * estático;
 * getmat() -- localizar la mejor vía, contar coincidencias: imprimir()
 * pr_align() -- imprimir alineación descrita en serie p[ ]: imprimir()
 * dumpblock() -- volcar un bloque de líneas con números, asteriscos: pr_align()
 * nums() -- eliminar una línea numérica: dumpblock()
 * putline() -- eliminar una línea (nombre, [num], sec, [num]): dumpblock()
 * asteriscos() -- poner una línea de asteriscos: dumpblock()
 * stripname() -- separar cualquier vía y prefijar desde una seqname

#include "nw.h"

#define SPC      3          /* línea de salida máxima */
#define P_LINE   256       /* espacio entre el nombre o num y sec */
#define P_SPC    3

extern _day[26][26];
int olen;                  /* ajustar la longitud de la línea de salida */
FILE *fx;                  /* línea de salida */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap;          /* solapamiento */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<primera secuencia: % (longitud = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<segunda secuencia: % (longitud = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* hueco principal en x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* hueco principal en y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) /* hueco de arrastre en x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) /* hueco de arrastre en y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
*retomar la primera vía, contar coincidencias
*/
static
geimai(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int      lx, ly;                /* "núcleo" (menos huecos finales) */
    int      firstgap, lastgap;     /* solapamiento de arrastre principal*/
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* obtener coincidencias totales, valor
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

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

    /* homología pct:
    * si penalizan los huecos finales, la base es la sec más corta
    * de lo contrario, descontar salientes y tomar el núcleo más corto
    */
    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 coincidencia% en un solapamiento de "d: %.2f similitud de porcentaje\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

Tabla 1 (cont.)

```

fprintf(fx, "<huecos en la primera secuencia: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "resto" (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", <huecos en la segunda secuencia: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapx, (dna)? "base": "resto", (ngapx == 1)? "" : "s");

        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<valor: %d (coincidencia=%d, desapareamiento=%d, penalización por hueco =%d+%d por base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<valor: %d (matriz Dayhoff PAM 250, penalización por hueco=%d+%d por resto)\n",
            smax, PINSO, PINSI);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<penalización por huecos finales, hueco final izquierdo: %d %s%s, hueco final derecho: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<huecos finales no penalizados\n");
}

static      nm;                /* coincidencias en el núcleo -- para comprobación */
static      lmax;              /* longitudes de nombres de archivos desnudos */
static      ij[2];             /* índice de salto para una vía */
static      nc[2];             /* cantidad de asteriscos de la línea actual */
static      ni[2];             /* cantidad de elementos actuales -- para generar huecos */
static      siz[2];
static char  *ps[2];            /* ptr para elemento actual */
static char  *po[2];            /* ptr para próxima salida de marca de car */
static char  out[2][P_LINE];    /* línea de salida */
static char  star[P_LINE];      /* establecer por asteriscos() */

/*
 * imprimir alineación descrita en vía de estructura pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;                /* recuento de car */
    int      more;
    register 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];
    }
}

```

pr_align

Tabla 1 (cont.)

```

for (nn = num = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * tenemos más de esta secuencia?
         */

        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /*espacio principal */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* en un hueco */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* estamos poniendo un elemento sec
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);

            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * estamos en el siguiente hueco de esta sec?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * necesitamos combinar todos los huecos
                 * en esta localización
                 */
                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;
    }
}

/*
 * volcamos un bloque de líneas, incluyendo números, asteriscos: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

--pr_align

dumpblock

Tabla 1 (cont.)

```

(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);
    }
}

/*
 * eliminar una línea numérica; dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* índice en out[ ] retener línea sec */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

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

/*
 * eliminar una línea (nombre, [num], sec, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

...dumpblock

nums

putline

Tabla 1 (cont.)

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

/* esto cuenta desde 1:
 * ni[ ] es el elemento actual (desde 1)
 * nc[ ] es la cantidad de asteriscos en la línea actual
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * poner una línea de asteriscos (secs siempre en 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 (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * retirar vía o prefijar desde pn, len de retorno: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                stripname
    char      *pn;          /* nombre de archivo (puede ser vía) */
{
    register char      *px, *py;

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * cleanup() -- limpiar cualquier archivo tmp
 * getseq() -- leer en sec, conjunto de ADN, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() con comprobación de errores
 * readjumps() -- obtener los saltos buenos, desde el archivo tmp si fuera necesario
 * writejmps() -- escribir una serie llena de saltos desde un archivo tmp: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char      *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* archivo tmp para saltos */
FILE      *fj;

int        cleanup();                          /* limpiar archivo tmp */
long       tseek();

/*
 * eliminar cualquier archivo tmp si se hace bien
 */
cleanup(i)                                     cleanup
{
    int      i;

    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * leer, retornar ptr para sec, conjunto de ADN, len, maxles
 * saltar líneas que empiecen con ';', '<' o '>'
 * sec en mayúsculas o minúsculas
 */
char      *
getseq(file, len)                             getseq
{
    char      *file;          /* nombre de archivo */
    int        len;          /* sec len */

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

...getseq

```

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

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

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    char *msg;                                        /* programa, rutina de llamada */
    int nx, sz;                                       /* cantidad y tamaño de elementos */

    char *px, *calloc();

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

/*
 * obtener saltos finales desde dx[ ] o archivo tmp, pp[ ], restablecer dmax: principal()
 */
readjumps()                                          readjumps
{
    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--)
                ;

```

Tabla 1 (cont.)

```

...readjumps

if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].j, 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: demasiados huecos en la alineación\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].j.n[j];
    xx = dx[dmax].j.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* hueco en la segunda sec */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1;
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignorar MAXGAP cuando se hacen huecos finales */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* hueco en la primera sec */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignorar MAXGAP cuando se hacen huecos finales */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* invertir el orden de saltos
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * escribir una estructura llena de saltos compensada de la previa (si la hubiera): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: no se puede hacer temp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: no se puede escribir %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Tabla 2

5	PRO	XXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
	Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácido coincidentes idénticos entre las dos secuencias polipeptídicas determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácido del polipéptido PRO) = 5 dividido por 15 = 33,3 %

Tabla 3

10	PRO	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
	Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de restos de aminoácido coincidentes idénticos entre las dos secuencias polipeptídicas determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácido del polipéptido PRO) = 5 dividido por 10 = 50 %

Tabla 4

20	ADN-PRO	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
	ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos coincidentes idénticos entre las dos secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico ADN-PRO) = 6 dividido por 14 = 42,9 %

Tabla 5

25	ADN-PRO	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
	ADN de comparación	NNNNLLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

30 % de identidad de secuencia de ácido nucleico =

(el número de nucleótidos coincidentes idénticos entre las dos secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico ADN-PRO) = 4 dividido por 12 = 33,3 %

II. Composiciones y métodos de la invención

A. Polipéptido PRO34128 de longitud completa

La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican polipéptidos mencionados en la presente solicitud como PRO34128. En particular, se ha identificado el ADNc que codifica un polipéptido PRO34128 y se ha aislado, como se describe en mayor detalle en los Ejemplos a continuación. Se aprecia que a las proteínas producidas en rondas diferentes de expresión se les puede dar diferentes números PRO pero que el número UNQ es único para cualquier ADN dado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo, por motivos de simplicidad, en la presente memoria descriptiva la proteína codificada el ADN194917-3044, así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de PRO34128, se mencionarán como "PRO34128", independientemente de su origen o de su modo de preparación.

Como se describe en los Ejemplos a continuación, se ha depositado un clon de ADNc denominado en este documento como ADN194917-3044 en la ATCC. La secuencia de nucleótidos real del clon puede determinarse fácilmente por un experto en la materia secuenciando el clon depositado usando métodos rutinarios en la técnica. La secuencia de aminoácidos predicha puede determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos usando habilidades rutinarias. Para el polipéptido PRO34128 y para el ácido nucleico codificante descrito en este documento, los solicitantes han identificado lo que se cree que es la fase de lectura mejor identificable con la información de secuencia disponible en el momento.

Usando el programa informático de alineación de secuencia ALIGN-2 mencionado anteriormente, se ha descubierto que la secuencia nativa de longitud completa PRO34128 (mostrada en la Figura 2 y en la SEQ ID NO: 2) tiene cierta identidad de secuencia de aminoácidos con AF045162_1. Por consiguiente, actualmente se cree que el polipéptido PRO34128 descrito en la presente solicitud es un miembro recién identificado de la familia de proteínas GDNFR y puede poseer una o más actividades biológicas y/o inmunológicas o propiedades típicas de esa familia de proteínas.

B. Variantes de PRO34128

Además de los polipéptidos PRO34128 de secuencia nativa de longitud completa descritos en este documento, se contempla que pueden prepararse variantes de PRO34128. Las variantes de PRO34128 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO34128, y/o por síntesis del polipéptido PRO34128 deseado. Los expertos en la materia apreciarán que cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales de PRO34128, tal como cambiando la cantidad y la posición de sitios de glucosilación o alterando las características de anclaje a membrana.

Pueden hacerse variaciones en PRO34128 de secuencia de longitud completa nativa o en diversos dominios de PRO34128 descrito en este documento, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO34128 que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos de PRO34128 en comparación con el PRO34128 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de PRO34128. Las directrices en la determinación del resto de aminoácido que puede insertarse, sustituirse o delecionarse sin afectar de forma adversa a la actividad deseada pueden encontrarse comparando la secuencia de PRO34128 con la de moléculas proteicas conocidas homólogas y minimizando la cantidad de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina con una serina, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Las inserciones o las delecciones pueden estar, opcionalmente, en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

Se proporcionan en este documento fragmentos del polipéptido PRO34128. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, en comparación con una proteína nativa de longitud completa. Dichos fragmentos carecen de restos de aminoácido que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO34128.

Los fragmentos de PRO34128 pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos de PRO34128 por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para escindir proteínas en sitios definidos por restos particulares de aminoácido, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico deseado, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplean oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos del polipéptido PRO34128 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO34128 nativo mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

Se muestran sustituciones conservativas de interés en la Tabla 1 bajo el encabezado de sustituciones preferidas. Si

dichas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y se exploran los productos.

5

Tabla 6

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
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	
Gly (G)	pro; ala	asp 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

Se consiguen modificaciones sustanciales en la función o en la identidad inmunológica del polipéptido PRO34128 seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoide, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de cadena lateral:

10

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

15

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

20

Las variaciones pueden hacerse métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], la mutagénesis con casete [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir el ADN de la variante de PRO34128.

25

30

También puede emplearse análisis por exploración de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de exploración preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, *J. Mol.-Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

35

40

C. Modificaciones de PRO34128

Se incluyen modificaciones covalentes de PRO34128 dentro del alcance de esta descripción. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácido diana de un polipéptido PRO34128 con un

agente orgánico de derivatización que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C-terminal del PRO34128. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO34128 con una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en el método para purificar anticuerpos anti-PRO34128, y viceversa. Los agentes de reticulación habitualmente usados incluyen, por ejemplo,

- 5 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.
- 10 Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutaminilo y asparaginilo en los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y de lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

15 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO34128 incluida dentro del alcance de esta descripción comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación nativo" pretende indicar, para los propósitos de este documento, deleciónar uno o más restos de carbohidrato encontrados en PRO34128 de secuencia nativa (retirando el sitio de glucosilación subyacente o deleciónando la glucosilación por

20 medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el PRO34128 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, que implica un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de carbohidrato presentes.

25 La adición de sitios de glucosilación al polipéptido PRO34128 puede conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración puede hacerse, por ejemplo, por la adición de, o por la sustitución por, uno o más restos de serina o de treonina en el PRO34128 de secuencia nativa (para sitios de glucosilación ligados a O). La secuencia de aminoácidos de PRO34128 puede alterarse opcionalmente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido PRO34128 en bases preseleccionadas de modo que se generen

30 codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumento de la cantidad de restos de carbohidrato en el polipéptido PRO34128 es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos en el polipéptido. Dichos métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*,

35 pág. 259-306 (1981).

La eliminación de restos de carbohidrato presentes en el polipéptido PRO34128 puede conseguirse de forma química o enzimática o por sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácido que sirven como dianas para la glucosilación. Las técnicas químicas de desglucosilación son conocidas en la técnica y se describen,

40 por ejemplo, por Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La escisión enzimática de los restos de carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse por el uso de diversas endo- y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO34128 comprende unir el polipéptido PRO34128 a uno de diversos

45 polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, del modo expuesto 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.

El PRO34128 de la presente descripción también puede modificarse de un modo para formar una molécula

50 quimérica que comprende PRO34128 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del PRO34128 con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo al que puede unirse de forma selectiva un anticuerpo anti-marcador. El epítipo marcador generalmente se coloca en el extremo amino o carboxilo terminal del PRO34128. La presencia de dichas formas

55 marcadas con epítipo del PRO34128 puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, proporcionar el epítipo marcador posibilita que el PRO34128 se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo marcador.

Diversos polipéptidos marcadores y sus anticuerpos respectivos son bien conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen marcadores polihistidina (poli-his) o polihistidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra el mismo [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y el marcador glucoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el polipéptido Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; un péptido de epítipo α -tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

65

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO34128 con una inmunoglobulina o con una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también mencionada como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones Ig preferiblemente incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana delecionado o inactivado) de un polipéptido PRO34128 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión con inmunoglobulina incluye las regiones de bisagra, CH2 y CH3, o de bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también la patente de Estados Unidos n.º 5.428.130 emitida el 27 de junio de 1995.

10 D. Preparación de PRO34128

La descripción a continuación se refiere principalmente a la producción de PRO34128 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico de PRO34128. Se contempla, por supuesto, que pueden emplearse métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar PRO34128. Por ejemplo, la secuencia de PRO34128, o partes de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando 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)]. Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente diversas partes del PRO34128 por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el PRO34128 de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica PRO34128

El ADN que codifica PRO34128 puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO34128 y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO34128 humano puede obtenerse de forma conveniente de una biblioteca de ADNc preparada de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO34128 también puede obtenerse de una biblioteca genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácido nucleico).

Las bibliotecas pueden explorarse con sondas (tales como anticuerpos contra el PRO34128 u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. La exploración de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos convencionales, tales como los descritos en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO34128 es usar la metodología de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los ejemplos a continuación describen técnicas para explorar una biblioteca de ADNc. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferiblemente de modo que pueda detectarse tras la hibridación al ADN en la biblioteca que 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. Las condiciones de hibridación, incluyendo rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook et al., *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos métodos de exploración de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de las regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica y como se describe en este documento.

El ácido nucleico que tiene la secuencia codificante de proteína puede obtenerse explorando bibliotecas seleccionadas de ADNc o genómicas usando la secuencia deducida de aminoácidos descrita en este documento por primera vez, y, si fuera necesario, usando procedimientos convencionales de extensión de cebadores como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento del ARNm que pueden no haberse transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras se transfectan o se transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en este documento para la producción de PRO34128 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según lo apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tal como el medio, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por los expertos en la materia sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a

Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*. Los métodos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como se describe en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación se usa generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, como se describe por Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamíferos sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas hospedadores de células de mamífero se han descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se realizan normalmente 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 usarse otros métodos para introducir ADN en células, tal como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policondriaciones, 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).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o para expresar el ADN en los vectores de este documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, aunque sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *E. coli*. Están disponibles al público diversas cepas de *E. coli*, tales 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* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como bacilos tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador particularmente preferido o un hospedador precursor porque es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para lograr una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el hospedador, incluyendo ejemplos de dichos hospedadores *E. coli* W3110 cepa IA2, 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 ompTkanf*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanf*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a canamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene la proteasa periplásmica mutante descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4.946.783 emitida el 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados métodos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadores de clonación o de expresión adecuados para vectores que codifican PRO34128. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior habitualmente usado. 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)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichiapastoris* (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* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores *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]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en este documento e incluyen, aunque sin limitación, levaduras con capacidad de crecimiento en metanol seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras en C. Anthony, *The Biochemistry of Methyloprotophytes*, 269 (1982).

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de PRO34128 glucosilado se obtienen de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. 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 por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de

ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula hospedadora apropiada se considera dentro de las habilidades de la técnica.

3. Selección y uso de un vector replicable

Al ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica PRO34128 puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están disponibles al público. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia apropiada de ácido nucleico puede insertarse en el vector por diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque 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 convencionales de ligamiento que son conocidas para los expertos en la materia.

El PRO34128 puede producirse de forma recombinante no solamente de forma directa, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o del polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica PRO34128 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, de grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una relacionada, así como líderes de secreción víricos.

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

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

Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que posibilitan la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO34128, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO deficiente en la actividad DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras 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 de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor unido de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO34128 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales son bien conocidos. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de β-lactamasa y lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], 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 de Shine-Dalgarno (S.D.) unida de forma funcional al ADN que codifica PRO34128.

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

enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinase, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

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

- La transcripción de PRO34128 a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como polioma virus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del
- 15 sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus 40 de simio (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas celulares hospedadores.

- 20 La transcripción de un ADN que codifica el PRO34128 por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción en *cis* de ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias potenciadoras ahora son conocidas a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el
- 25 potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante de PRO34128, pero está localizado preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

- 30 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están habitualmente disponibles desde regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o víricos o
- 35 ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO34128.

- En otros métodos, se describen vectores y células hospedadoras adecuadas para la adaptación a la síntesis de PRO34128 en cultivo de células recombinantes de vertebrado en Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-06 (1979); documento EP 117.060; y documento EP 117.058.

40

4. Detección de amplificación/expresión génica

- La amplificación y/o la expresión génica pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm
- 45 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia en manchas (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basada en las secuencias proporcionadas en este documento. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo puede realizarse cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que, tras la
- 50 formación del dúplex sobre la superficie, puede detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

- La expresión génica, como alternativa, puede medirse por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o de secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o de fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o
- 55 ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO34128 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en este documento o contra una secuencia exógena fusionada al ADN de PRO34128 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

- 60 5. Purificación del polipéptido

- Las formas de PRO34128 pueden recuperarse del medio de cultivo o de los lisados de células hospedadoras. Si están unidas a membrana, se pueden liberar de la membrana usando una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o por escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión de PRO34128 pueden
- 65 alterarse por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o agentes de lisis celular.

Puede que se desee purificar PRO34128 de proteínas o de polipéptidos celulares recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos adecuados de purificación: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación en etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para retirar contaminantes tales como IgG y columnas quelantes de metales para unirse a formas marcadas con epítopo del PRO34128. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos 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 seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y el PRO34128 particular producido.

E. Usos para PRO34128

Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican PRO34128 tienen diversas aplicaciones en la técnica de biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y de genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico de PRO34128 también será útil para la preparación de polipéptidos PRO34128 por las técnicas recombinantes descritas en este documento.

El gen de PRO34128 de secuencia nativa de longitud completa (SEQ ID NO: 1) o partes del mismo, pueden usarse como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de PRO34128 de longitud completa o para aislar otros ADNc más (por ejemplo, aquellos que codifican variantes de origen natural de PRO34128 o de PRO34128 de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de PRO34128 descrita en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden obtenerse de regiones al menos parcialmente novedosas de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 donde esas regiones pueden determinarse sin experimentación excesiva o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores o intrones de PRO34128 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un método de selección comprenderá aislar la región codificante del gen de PRO34128 usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse por diversos marcadores, incluyendo radionucleótidos tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria con la del gen de PRO34128 de la presente invención pueden usarse para explorar bibliotecas de ADNc humano, de ADN genómico o de ARNm para determinar los miembros de dichas bibliotecas que hibridan con la sonda. Las técnicas de hibridación se describen en detalle adicional en los Ejemplos a continuación.

Asimismo, puede emplearse cualquier secuencia EST descrita en la presente solicitud como sondas, usando los métodos descritos en este documento.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de PRO34128 incluyen oligonucleótidos antisentido o con sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ARN o ADN) capaz de unirse al ARNm de PRO34128 diana (con sentido) o secuencias de ADN de PRO34128 (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o con sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de PRO34128. Dicho fragmento generalmente comprende al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de obtener un oligonucleótido antisentido o con sentido, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) y van der Krol et al. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos antisentido o con sentido a secuencias de ácido nucleico diana produce la formación de dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, incluyendo degradación potenciada de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o de la traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido, por tanto, pueden usarse para bloquear la expresión de proteínas PRO34128. Los oligonucleótidos antisentido o con sentido comprenden adicionalmente oligonucleótidos que tienen estructuras de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces de azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629) y donde dichos enlaces son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana.

Otros ejemplos de oligonucleótidos con sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10048, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-isina). Además, pueden unirse agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a oligonucleótidos con sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o con sentido por la secuencia de nucleótidos diana.

Los oligonucleótidos antisentido o con sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido

nucleico diana por cualquier método de transferencia génica incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación o usando vectores de transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, el oligonucleótido antisentido o con sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, aunque sin limitación, los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de doble copia denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

Los oligonucleótidos con sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana por formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, aunque sin limitación, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligando que se unen a receptores de superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión al ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o a su receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido con sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Como alternativa, un oligonucleótido con sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por formación de un complejo de oligonucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido con sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

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

Las sondas también pueden emplearse en técnicas de PCR para generar una combinación de secuencias para la identificación de secuencias codificantes de PRO34128 muy relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un PRO34128 también pueden usarse para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica ese PRO34128 y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en este documento pueden mapearse en un cromosoma y en regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de vinculación frente a marcadores cromosómicos conocidos y exploración de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes para PRO34128 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el PRO34128 es un receptor), el PRO34128 puede usarse en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Por dichos métodos, pueden identificarse inhibidores de la interacción de unión de receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también pueden usarse para detectar inhibidores peptídicos o de molécula pequeña o agonistas de la interacción de unión. Además, el receptor PRO34128 puede usarse para aislar uno o más ligando correlativos. Los ensayos de exploración pueden diseñarse para encontrar compuestos principales que imitan la actividad biológica de un PRO34128 nativo o de un receptor para PRO34128. Dichos ensayos de exploración incluirán ensayos susceptibles a exploración de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de exploración bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican PRO34128 o sus formas modificadas también pueden usarse para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y la detección de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal no humano que tiene células que contienen un transgén, dicho transgén se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en una fase prenatal, por ejemplo, en una fase embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica PRO34128 puede usarse para clonar ADN genómico que codifica PRO34128 de acuerdo con técnicas establecidas y las secuencias genómicas se pueden usar para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PRO34128. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, han llegado a ser convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, células particulares se abordarían para incorporación del transgén PRO34128 con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de

un transgén que codifica PRO34128 introducido en la línea germinal del animal en una fase embrionaria pueden usarse para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica PRO34128. Dichos animales pueden usarse como animales de ensayo para reactivos que se cree que confieren protección contra, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. De acuerdo con esta faceta de la invención, un animal se trata con el reactivo y una incidencia reducida de la afección patológica, en comparación con animales no tratados que albergan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para la afección patológica.

Como alternativa, pueden usarse homólogos no humanos de PRO34128 para construir un animal no humano "knock out" de PRO34128 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica PRO34128 como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PRO34128 y el ADN genómico alterado que codifica PRO34128 introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO34128 puede usarse para clonar ADN genómico que codifica PRO34128 de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PRO34128 puede delecionarse o remplazarse con otro gen, tal como un gen codifica un marcador de selección que puede usarse para controlar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases del ADN flanqueante inalterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y las células en que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno se seleccionan [véase, por ejemplo, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas después se inyectan en un blastocisto 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 de cría hembra pseudopreñada adecuado y el embrión se puede llevar a término para crear un animal "knock out". La descendencia que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knock out pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas afecciones patológicas o por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO34128.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos PRO34128 también puede usarse en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células para conseguir la síntesis *in vivo* de un producto génico terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para el remplazo de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye terapia génica convencional donde se consigue un efecto duradero por un único tratamiento, y por la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración en una vez o repetida de un ADN o un ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARN o ADN antisentido pueden usarse como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que pueden importarse oligonucleótidos antisentido cortos a células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación restringida por la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Existe diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del hospedador pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato cálcico, etc. Las técnicas actualmente preferidas de transferencia génica *in vivo* incluyen transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y transfección mediada por proteína envuelta vírica-liposoma (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es preferible proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente que aborde las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis para abordar y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápsida o fragmentos de las mismas con tropismo por un tipo celular particular, anticuerpos contra proteínas que experimentan internalización en ciclo, proteínas que abordan la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de protocolos de marcaje génico y de terapia génica, véase Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992).

Los polipéptidos descritos en este documento también pueden emplearse como marcadores de peso molecular con propósitos de electroforesis de proteínas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos PRO34128 o los fragmentos de los mismos descritos en este documento son útiles para la identificación de cromosomas. A este respecto, existe una necesidad permanente de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente están disponibles relativamente pocos reactivos de marcaje cromosómico, basándose en los datos reales de secuencia. Cada molécula de ácido nucleico de PRO34128 de la presente invención puede usarse como un marcador cromosómico.

Los polipéptidos PRO34128 y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden usarse para el tipado tisular, donde los polipéptidos PRO34128 de la presente invención pueden expresarse de forma diferencial en un tejido en comparación con otro. Las moléculas de ácido nucleico de PRO34128 encontrarán uso para generar sondas para PCR, análisis de Northern, análisis de Southern y análisis de Western.

Los polipéptidos PRO34128 descritos en este documento también pueden emplearse como agentes terapéuticos. Los polipéptidos PRO34128 de la presente invención pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por los cuales el producto PRO34128 se combine en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes 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 incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos u otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

Las formulaciones a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes de o después de liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas de este documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene una vía de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

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

Las dosificaciones y concentraciones deseadas de fármaco de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular concebido. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada pertenece a las habilidades de un médico ordinario. Los experimentos con animales proporcionan directrices fiables para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. Puede realizarse un cambio de escala entre especies de las dosis eficaces siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pág. 42-96.

Cuando se emplea administración *in vivo* de un polipéptido PRO34128 o un agonista o un antagonista del mismo, las cantidades normales de dosificación pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg del peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. Las directrices en cuanto a dosificaciones particulares y métodos de suministro se proporcionan en la bibliografía; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se prevé que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o a un tejido, por ejemplo, puede necesitar el suministro de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

Cuando se desea administración de liberación sostenida de un polipéptido PRO34128 en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración del polipéptido PRO34128, se contempla la microencapsulación del polipéptido PRO34128. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado satisfactoriamente con la hormona humana del crecimiento (rhGH), con interferón (rhIFN-), interleuquina-2 y MN rgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), pág. 439-462; documento WO 97/03692, documento WO 96/40072, documento WO 96/07399; y patente de Estados Unidos n.º 5.654.010.

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

Se describen métodos de detección de compuesto para identificar aquellos que imitan el polipéptido PRO34128 (agonistas) o evitan el efecto del polipéptido PRO34128 (antagonistas). Los ensayos de detección para candidatos de fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen a o forman complejos con los polipéptidos PRO34128 codificados por los genes identificados en este documento, o interfieren de otro modo con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de detección incluirán ensayos susceptibles a exploración de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármaco de molécula pequeña.

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

Todos los ensayos para antagonistas son comunes porque requieren el contacto del candidato de fármaco con un polipéptido PRO34128 codificado por un ácido nucleico identificado en este documento en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En 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, el polipéptido PRO34128 codificado por el gen identificado en este documento o el candidato de fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, por unión covalente o no covalente. La unión no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO34128 y secando. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO34128 a inmovilizarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse por un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, los componentes que no han reaccionado se retiran, por ejemplo, por lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido la formación de complejos. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta un marcador, puede detectarse la formación de complejos, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

So el compuesto candidato interacciona, pero no se une a un polipéptido PRO34128 particular codificado por un gen identificado en este documento, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse por métodos bien conocidos para detectar interacciones de proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, entrecruzamiento, co-inmunoprecipitación y co-purificación a través de gradientes o de columnas cromatográficas. Además, las interacciones de proteína-proteína pueden controlarse usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (Londres), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) como se describe por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levaduras, consisten en dos dominios modulares físicamente concretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, y el otro que funciona como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levaduras descrito en las publicaciones anteriores (mencionado generalmente como el "sistema de doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en que la proteína diana está fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en que las proteínas activadoras candidatas están fusionadas al dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción de proteína-proteína. Se detectan colonias que contienen polipéptidos de interacción con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Está disponible en el mercado un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones de proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de doble híbrido en Clontech. Este sistema también puede ampliarse para mapear dominios proteicos implicados en las interacciones de proteínas específicas, así como para localizar restos de aminoácido que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO34128 identificado en este documento y otros componentes intra o extracelulares pueden ensayarse del siguiente modo: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y la unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato de inhibir la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, para que sirva como control positivo. La unión (formación de complejos) entre el compuesto de ensayo y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla como se describe anteriormente en este documento. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su compañero de reacción.

Para ensayar antagonistas, el polipéptido PRO34128 puede añadirse a una célula junto con el compuesto a explorarse para una actividad particular y la capacidad del compuesto de inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido PRO34128 indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO34128. Como alternativa,

pueden detectarse antagonistas combinando el polipéptido PRO34128 y un antagonista potencial con receptores del polipéptido PRO34128 unido a membrana o receptores recombinantes en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO34128 puede marcarse, tal como por radiactividad, de modo que puede usarse la cantidad de moléculas de polipéptido PRO34128 unidas al receptor para determinar la eficacia del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor puede identificarse por numerosos métodos conocidos para los expertos en la materia, por ejemplo, selección de ligando y clasificación FACS. Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ADN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido PRO34128 y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en combinaciones y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO34128. Las células transfectadas que se hacen crecer en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido PRO34128 marcado. El polipéptido PRO34128 puede marcarse por diversos medios incluyendo yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Después de la fijación y la incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradigráfico. Se identifican combinaciones positivas y se preparan subcombinaciones y se vuelven a transfectar usando un proceso de subcombinación y re-exploración interactiva, produciendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para la identificación de receptores, el polipéptido PRO34128 marcado puede unirse por fotoafinidad con la membrana celular o extraer preparaciones que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve por PAGE y se expone a película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede escindirse, resolverse en fragmentos peptídicos y someterse a microsecuenciación proteica. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se usaría para diseñar un conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para explorar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamífero o una preparación de membrana que expresa el receptor se incuban con el polipéptido PRO34128 marcado en presencia del compuesto candidato. Entonces podría medirse la capacidad del compuesto de potenciar o de bloquear esta interacción.

Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido PRO34128 y, en particular, anticuerpos incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotipo y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo. Como alternativa, un antagonista potencial puede ser una proteína muy relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO34128 que reconoce el receptor, pero no confiere ningún efecto, inhibiendo de ese modo de forma competitiva la acción del polipéptido PRO34128.

Otro antagonista potencial del polipéptido PRO34128 es una construcción de ARN o de ADN antisentido preparada usando tecnología antisentido donde, por ejemplo, una molécula de ARN o de ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm hibridando con el ARNm diana y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de triple hélice o ADN o ARN antisentido, estando basados dichos dos métodos en la unión de un polinucleótido a ADN o a ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica los polipéptidos PRO34128 maduros de este documento, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)), evitando de ese modo la transcripción y la producción del polipéptido PRO34128. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO34128 (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden suministrarse a las células de modo que el ARN o el ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO34128. Cuando se usa ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones aproximadamente -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, al sitio de unión al receptor o al factor de crecimiento o a otro sitio de unión relevante del polipéptido PRO34128, bloqueando de ese modo la actividad biológica normal del polipéptido PRO34128. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, aunque sin limitación, péptidos pequeños o moléculas de tipo péptido, preferiblemente péptidos solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica de ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido por escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión por ribozima dentro de una diana de ARN potencial pueden identificarse por 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).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deben ser

monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de modo que promueva la formación de triple hélice a través de normas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requiere considerables tramos de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, la publicación WO 97/33551, *supra*.

5 Estas moléculas pequeñas pueden identificarse por uno cualquiera o más de los ensayos de detección analizados anteriormente en este documento y/o por cualquier otra técnica de detección bien conocida para los expertos en la materia.

10 Los usos de diagnóstico y terapéuticos de las moléculas descritas en este documento también pueden basarse en los datos de ensayo positivo divulgados y descritos a continuación.

F. Anticuerpos anti-PRO34128

15 La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos anti-PRO34128. Los anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

20 Los anticuerpos anti-PRO34128 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden crearse en un mamífero, por ejemplo, por una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO34128 o una proteína de
25 fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por
30 un experto en la materia sin experimentación excesiva.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-PRO34128 pueden ser, como alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos
35 monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, normalmente se inmuniza con un agente inmunizante para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

40 El agente inmunizante normalmente incluirá el polipéptido PRO34128 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos después se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para
45 formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas habitualmente son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las
50 células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), que son sustancias que evitan el crecimiento de células HGPRT-deficientes.

55 Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una expresión de alto nivel estable de anticuerpos por las células seleccionadas productoras de anticuerpo y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de
60 heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63].

65 El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma después puede ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO34128. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de

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

5 Después de identificarse las células deseadas de hibridoma, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales [Goding, *supra*]. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI 1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como fluido ascítico en un mamífero.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o del fluido ascítico por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, en proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

15 Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, 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 usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfieren a células
20 hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en el lugar de las secuencias murinas homólogas [patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison et al., *supra*] o uniendo de forma covalente
25 a la secuencia codificante de la inmunoglobulina todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina puede sustituirse en el lugar de los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse en el lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

30 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 de inmunoglobulina y de la cadena pesada modificada. La cadena pesada generalmente se trunca en cualquier punto en la región Fc para evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Como alternativa, los restos relevantes de cisteína se sustituyen con otro resto de aminoácido o se delecionan para evitar el entrecruzamiento.

35 También están disponibles métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

40 3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-PRO34128 de la invención pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpo humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son
45 inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que se rempazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata, conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se rempazan restos de la región flanqueante Fv de
50 la inmunoglobulina humana por restos no humano correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o flanqueantes importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

60 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácido no humanos a menudo se mencionan como restos "introducidos", que normalmente se recogen de un dominio variable "introducido". La humanización puede realizarse 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 o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos

"humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en que algunos restos CDR y posiblemente algunos restos FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fago [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y de Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991)]. Asimismo, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, en ratones en que los genes endógenos de inmunoglobulina se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo reordenamiento génico, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque 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).

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para PRO34128, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. A causa de la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpo, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue habitualmente por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene 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 diferentes, y co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperará del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo se rempazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes sobre la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo remplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento donde anticuerpos intactos se escinden de forma proteolítica para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos ditiol arsenito sódico para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB después se vuelve a convertir en el Fab'-tiol por 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 usarse como agentes para la inmovilización selectiva

de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula Fab' de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumorales de mama humana.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y después se re-oxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven forzados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos por el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítomos diferentes en un polipéptido PRO34128 dado en este documento. Como alternativa, puede combinarse un brazo anti-polipéptido PRO34128 con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o a receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido PRO34128 particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan un polipéptido PRO34128 particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a PRO34128 y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO34128 y se une adicionalmente al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas [patente de Estados Unidos n.º 4.676.980], y para el tratamiento de infección por VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellas que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980.

6. Modificación por ingeniería de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, puede introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad mejorada de internalización y/o eliminación 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 usando reticulantes heterobifuncionales como se describe en Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede modificarse por ingeniería un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener de ese modo capacidades de lisis por complemento y por ADCC potenciadas. Véase, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design. 3: 219-230 (1989).

7. Inmunconjugados

La descripción también se refiere a inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente

citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

- 5 Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

- 15 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando diversos agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de astolieno) y compuestos bis-activos de flúor (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) en un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de un radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

- 25 En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la prefocalización de tumores donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

30 8. Inmunoliposomas

- Los anticuerpos descritos en este 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 en las patentes de Estados Unidos n.º 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.013.556.

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

45 9. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

- Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido PRO34128 identificado en este documento, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de detección descritos anteriormente en este documento, pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

- Si el polipéptido PRO34128 es intracelular y se usan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse de forma química y/o producirse por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

- La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según lo necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa unos a otros. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como acetato de etilen vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el organismo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

G. Usos para anticuerpos anti-PRO34128

Los anticuerpos anti-PRO34128 de la invención tienen diversas utilidades. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-PRO34128 en ensayos de diagnóstico para PRO34128, por ejemplo, detectando su expresión en células específicas, tejidos o suero. Pueden usarse diversas técnicas de ensayo diagnóstico conocidas en la técnicas, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola; Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pág. 147-158]. Los anticuerpos usados en los ensayos de diagnóstico pueden marcarse con un resto detectable. El resto detectable debe ser capaz de producir, de forma directa o indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano rústico. Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al resto detectable, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); y Nygren, J. *Histochem. and Cytochem.*, 30:407 (1982).

Los anticuerpos anti-PRO34128 también son útiles para la purificación por afinidad de PRO34128 a partir de cultivo de células recombinantes o de fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra PRO34128 se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como resina Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado después se pone en contacto con una muestra que contiene el PRO34128 a purificar, y después de ello el soporte se lava con un disolvente adecuado que retirará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el PRO34128, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el PRO34128 del anticuerpo.

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

Ejemplos

Se usaron reactivos disponibles en el mercado mencionados en los ejemplos de acuerdo con las instrucciones del fabricante salvo que se indique de otro modo. La fuente de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y durante toda la memoria descriptiva, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ejemplo 1. Aislamiento de clones de ADNc que codifican una PRO34128 humana

Se usaron secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia señal de secreción, si la hay) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos pública Swiss-Prot para la búsqueda de

bases de datos de secuencias. Las bases de datos incluían bases de datos públicas (por ejemplo, GenBank). En este caso, se analizó la secuencia de ADN genómico de GenBank usando el programa de predicción de genes GENSCAN, con licencia de la Stanford University. El análisis GENSCAN predice regiones codificantes génicas, creando secuencias que pueden someterse a la búsqueda ECD. La búsqueda se realizó usando el programa informático BLAST o BLAST2 [Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como una comparación de las secuencias proteicas ECD con una traducción de 6 tramos de las secuencias. Aquellas comparaciones que producían un valor BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o mayor que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y se ensamblaron en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington) si fuera necesario. Se ensambló una secuencia de ADN consenso.

Basándose en la secuencia consenso descrita anteriormente, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar por 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 PRO34128. Los cebadores de PCR directos e inversos generalmente varían de 20 a 30 nucleótidos y a menudo se diseñan para dar un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de sonda son normalmente 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 el ADN de las bibliotecas por amplificación por PCR, según Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, con el par de cebadores de PCR. Después se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codifican el gen de interés usando el oligonucleótido de sonda y uno de los pares de cebadores.

Se usó una combinación de 50 diferentes bibliotecas de ADNc humano de diversos tejidos en la clonación. Las bibliotecas de ADNc usadas para aislar los clones de ADNc se construyeron por métodos convencionales usando reactivos disponibles en el mercado tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio NotI, unido con extremos romos a adaptadores Sall hemitratados con quinasa, escindidos con NotI, dimensionados apropiadamente por 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 Sfil; véase, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

La secuenciación de ADN de los clones aislados descritos anteriormente dio la secuencia de ADN de longitud completa para un polipéptido PRO34128 de longitud completa (denominado en este documento como ADN 194917-3044 [Figura 1, SEQ ID NO: 1]) y la secuencia proteica derivada para ese polipéptido PRO34128.

El clon de longitud completa identificado anteriormente contenía una única fase de lectura abierta con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones de los nucleótidos 88-90 y una señal de parada en las posiciones de los nucleótidos 1270-1272 (Figura 1, SEQ ID NO: 1). El precursor polipeptídico predicho es de 394 aminoácidos de longitud, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 44528 dalton y un pI estimado de aproximadamente 8,34. El análisis de la secuencia de PRO34128 de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) evidencia la presencia de diversos dominios polipeptídicos importantes como se muestra en la Figura 2, donde las localizaciones dadas para esos dominios polipeptídicos importantes son aproximados como se describe anteriormente. El clon ADN 194917-3044 se ha depositado en la ATCC el 30 de enero de 2001 y se le ha asignado el n.º de depósito de la ATCC: PTA-2985.

Ejemplo 2: Uso de PRO34128 como sonda de hibridación

El siguiente método describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO34128 como una sonda de hibridación.

Se emplea ADN que comprende la secuencia codificante de PRO34128 de longitud completa o madura como una sonda para detectar ADN homólogos (tales como que codificantes variantes de origen natural de PRO34128) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o en bibliotecas genómicas de tejido humano.

La hibridación y el lavado de los filtros que contienen cada ADN de la biblioteca se realiza en las siguientes condiciones de alta rigurosidad. La hibridación de la sonda derivada de PRO34128 radiomarcada a los filtros se realiza en una solución de formamida al 50 %, SSC 5 x, SDS al 0,1 %, pirofosfato sódico al 0,1 %, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardt 2 x 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 0,1 x y SDS al 0,1 % a 42 °C.

Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica PRO34128 de secuencia nativa de longitud completa después pueden identificarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Ejemplo 3: Expresión de PRO34128 en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de PRO34128 por expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica PRO34128 se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede emplearse diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase, Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para resistencia a ampicilina y a tetraciclina. El vector se digiere con la enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas por PCR después se ligan en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor trp, un líder poli-His (que incluye los seis primeros codones STII, secuencia poli-His y sitio de escisión con enteroquinasa), la región codificante de PRO34128, el terminador transcripcional lambda y un gen argU.

La mezcla de ligamiento después se usa para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en Sambrook et al., *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad de crecer en placas LB y después se seleccionan las colonias resistentes a antibiótico. El ADN plasmídico puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los clones seleccionados pueden cultivarse durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo durante una noche posteriormente puede usarse para inocular un cultivo a mayor escala. Las células después se cultivan hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recogerse por centrifugación. El sedimento celular obtenido por la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO34128 solubilizada después puede purificarse usando una columna quelante de metales en condiciones que permiten la estrecha unión de la proteína.

PRO34128 puede expresarse en *E. coli* en una forma marcada con poli-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO34128 inicialmente se amplifica usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio eficaz y fiable de la traducción, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias marcadas con poli-His, amplificadas por PCR después se ligan en un vector de expresión, que se usa para transformar un hospedador de *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes primero se cultivan en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una D.O.600 de 3-5. Los cultivos después se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico-2142O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF 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. Las muestras se retiran para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE, y el cultivo en bruto se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y el replegamiento.

Se resuspende la pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (6-10 gramos de sedimentos) en 10 volúmenes (p/v) en tampón guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetratratato sódico 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 produce una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteínas bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 minutos. 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 aclararlo. El extracto aclarado se carga en una columna quelante de metales Qiagen Ni-NTA 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 combinan y almacenan a 4 °C. La concentración de proteínas se estima por su absorbancia a 250 nM usando el coeficiente de extinción calculado basado en su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0.3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligen de modo que la concentración final de proteína esté entre 50 a 100 µg/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se detiene por 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 en fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80 %. Las alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 se analizan en geles de SDS poliacrilamida y las fracciones que contienen la proteína replegada homogénea se combinan. Generalmente, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo ya 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 se eluyen a concentraciones mayores de

acetónitrilo. Además de resolver las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa en fase inversa también retira las endotoxinas de las muestras.

Las fracciones que contienen el polipéptido PRO34128 plegado deseado se combinan y se retira el acetónitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4 % por diálisis o por filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Farmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran a esterilidad.

Ejemplo 4: Expresión de PRO34128 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de PRO34128 por expresión recombinante en células de mamífero.

Se emplea el vector pRK5 (véase el documento EP 307,247, publicado el 15 de marzo de 1989), como vector de expresión. Opcionalmente, se liga el ADN de PRO34128 en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO34128 usando métodos de ligamiento tales como los descritos en Sambrook et al., *supra*. El vector resultante se llama pRK5-PRO34128.

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan hasta confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM suplementado con suero fetal de ternera y, opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO34128 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 0,227 M. A esta mezcla se añade, 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 sedimenten durante aproximadamente 4 horas a 37 °C. El medio de cultivo se retira por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol en PBS durante 30 segundos. Las células 293 después se lavan con medio sin suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (en solitario) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un periodo seleccionado de tiempo para revelar la presencia de polipéptido PRO34128. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se ensaya en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, puede introducirse PRO34128 en células 293 de forma transitoria usando el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Las células 293 se cultivan hasta una densidad máxima en un matraz rotatorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO34128. Las células primero se concentran a partir de los matraces rotatorios por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante 4 horas. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y se vuelven a introducir en el matraz de agitación que contiene medio de cultivo tisular, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente 4 días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para retirar las células y los desechos. La muestra que contiene PRO34128 expresado después puede concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, PRO34128 puede expresarse en células CHO. El pRK5-PRO34128 puede introducirse por transfección en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse y puede reemplazarse el medio con medio de cultivo (en solitario) o medio que contiene un radio marcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO34128, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio condicionado. El medio que contiene el PRO34128 expresado después puede concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado.

También puede expresarse PRO34128 marcado con epítipo en células CHO hospedadoras. El PRO34128 puede subclonarse del vector pRK5. El inserto del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en fase con una marca de epítipo seleccionada tal como una marca poli-His en un vector de expresión de baculovirus. El inserto de PRO34128 marcado con poli-His después puede subclonarse en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de los clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se describe anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, como se describe anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO34128 marcado con poli-His expresado después puede concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato.

También puede expresarse PRO34128 en células CHO y/o COS por in procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

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

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

Se introducen 12 µg del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección disponibles en el mercado Superfect® (Quiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas et al., *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para crecimiento y producción adicionales como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan por colocación en un baño de agua y se mezclan por agitación con vórtice. Los contenidos se pipetea 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 selectivo (PS20 filtrado a 0,2 micrómetros con suero bovino fetal al 5 % diafiltrado a 0,2 micrómetros). Las células después se dividen en alícuotas en una centrifuga de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a una centrifuga de 250 ml con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37 °C. Después de otros 2-3 días, se siembran centrifugas de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio fresco por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede emplearse cualquier medio CHO adecuado, realmente puede usarse un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.122.469, emitida el 16 de junio de 1992. Se siembra una centrifuga de producción de 3 l a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina pH del número de células. En el día 1, la centrifuga se muestrea y se comienza el rociado con aire filtrado. En el día 2, la centrifuga spinner se muestrea, se cambia la temperatura a 33 °C y se recogen 30 ml de glucosa a 500 g/litro y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, Dow Corning 365 emulsión de calidad médica). Durante toda la producción, el pH se ajusta según lo necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70 %, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros. El filtrado se almacena a 4 °C o se carga inmediatamente en columnas para su purificación.

Para las construcciones marcadas con poli-His, las proteínas se purifican usando una columna 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 Ni-NTA de 6 ml equilibrada en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min a 4 °C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrado que contienen imidazol 0,25 M. la proteína altamente purificada posteriormente se desala en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4 %, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacena a -80 °C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican del medio condicionado del siguiente modo. El medio condicionado se bombea en una columna de proteína A (Pharmacia) de 5 ml que se había equilibrado en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava intensamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 2,75 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desala en tampón de almacenamiento como se describe anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa por geles de SDS poliacrilamida y por secuenciación de aminoácidos N-terminales por degradación de Edman.

Ejemplo 5: Expresión de PRO34128 en levaduras

El siguiente método describe la expresión recombinante de PRO34128 en levaduras.

En primer lugar, se construyen vectores de expresión en levadura para la producción intracelular o secreción de PRO34128 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO34128 y el promotor se insertan en sitios adecuados de enzimas de restricción en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de

PRO34128. Para la secreción, el ADN que codifica PRO34128 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal nativo de PRO34128 y otro péptido señal de mamífero o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia señal/líder de secreción de invertasa, y secuencias enlazadoras (si fuera necesario) para la expresión de PRO34128.

Las células de levadura, tal como la cepa de levaduras AB110, después puede transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levaduras transformadas pueden analizarse por precipitación con ácido tricloroacético al 10 % y separación por SDS-PAGE, seguido por tinción de los geles con azul de Coomassie.

El PRO34128 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse retirando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y después concentrando el medio usando filtros de cartuchos seleccionados. El concentrado que contiene PRO34128 puede purificarse adicionalmente usando resinas de cromatografía en columnas seleccionadas.

Ejemplo 6: Expresión de PRO34128 en células de insecto infectadas con baculovirus

El siguiente método describe la expresión recombinante de PRO34128 en células de insecto infectadas con baculovirus.

La secuencia codificante de PRO34128 se fusiona en dirección 5' de una marca de epítipo contenida dentro de un vector de expresión de baculovirus. Dichas marcas de epítipo incluyen marcas poli-His y marcas de inmunoglobulina (como regiones Fc de IgG). Puede emplearse diversos plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia que codifica PRO34128 o la parte deseada de la secuencia codificante de PRO34128 tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto después se digiere con esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera por co-transfección del plásmido anterior y el ADN vírico BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (disponible en el mercado en GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28 °C, los virus liberados se recogen y se usan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión proteica se realizan como se describe por O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994).

El PRO34128 marcado con poli-His expresado después puede purificarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad con Ni²⁺-quelato del siguiente modo. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe por Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, 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 sonicán dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 7,8) y se filtran a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Se prepara una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (disponible en el mercado en Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta A₂₈₀ basal con tampón de carga, punto en el cual se inicia la recogida 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 la proteína unida de forma no específica. Después de alcanzar A₂₈₀ basal de nuevo, la columna se revela con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o por transferencia de Western con Ni²⁺-NTA-conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO34128 marcado con His₁₀ eluido se combinan y dializan frente a tampón de carga.

Como alternativa, la purificación del PRO34128 marcado con IgG (o marcado con Fc) puede realizarse usando técnicas conocidas de cromatografía, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o de proteína G.

Ejemplo 7: Preparación de anticuerpos que se unen a PRO34128

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO34128.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Los inmunógenos que puede emplearse incluyen PRO34128 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO34128 y células que expresan PRO34128 recombinantes sobre la superficie celular. La selección del inmunógeno puede hacerse por un experto en la materia sin experimentación excesiva.

Se inmunizan ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno PRO34128 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se les inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal una cantidad de 1-1000 microgramos. Como alternativa, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas plantares posteriores del animal. Los ratones inmunizados después se refuerzan de 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después de ello, durante varias semanas, los ratones también se refuerzan con inyecciones adicionales de inmunización. Pueden obtenerse periódicamente muestras de suero obtenidas de los ratones por exanguinación retro-orbital para su ensayo en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO34128.

Después de haber detectado un título adecuado de anticuerpos, a los animales "positivos" para los anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO34128. De tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recogen las células esplénicas. Las células esplénicas entonces se fusionan (usando polietilenglicol al 35 %) a una línea celular de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponible en la ATCC, n.º CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después pueden sembrarse en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células esplénicas.

Las células de hibridoma pueden explorarse en un ELISA para su reactividad contra PRO34128. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO34128 pertenece a las habilidades de la técnica.

Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir fluido ascítico que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PRO34128. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo tisular o frascos rotatorios. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el fluido ascítico puede conseguirse usando precipitación en sulfato amónico, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, puede emplearse cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a proteína A o a proteína G.

Ejemplo 8: Purificación de polipéptidos PRO34128 usando anticuerpos específicos

Los polipéptidos PRO34128 nativos o recombinantes pueden purificarse por diversas técnicas convencionales en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO34128, el polipéptido PRO34128 maduro o el polipéptido pre-PRO34128 se purifican por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO34128 de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad por acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido a una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes por precipitación con sulfato amónico o por purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de fluido ascítico de ratón por precipitación con sulfato amónico o cromatografía en proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO34128 preparando una fracción a partir de células que contienen polipéptido PRO34128 en una forma soluble. Esta preparación se obtiene por solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial por la adición de detergente o por otros métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el polipéptido PRO34128 soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil al medio en que están creciendo las células.

Una preparación que contiene polipéptido PRO34128 soluble se pasa sobre la columna de afinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorción preferente del polipéptido PRO34128 (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que alteran la unión del anticuerpo/polipéptido PRO34128 (por ejemplo, tampón de bajo pH tal como aproximadamente pH 2-3, o una alta concentración de un caótropro tal como urea o ión tiocianato) y se recoge el polipéptido PRO34128.

Ejemplo 9: Selección de fármacos

Esta invención es particularmente útil para seleccionar compuestos usando polipéptidos PRO34128 o fragmentos de unión de los mismos en cualquiera de diversas técnicas de selección de fármacos. El polipéptido PRO34128 o el fragmento empleado en dicho ensayo puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, portado sobre una superficie celular o localizado de forma intracelular. Un método de selección de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que están transformadas de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO34128 o el fragmento. Los fármacos se seleccionan frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, en forma viable o fija, pueden usarse para ensayos convencionales de unión. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido

PRO34128 o un fragmento y el agente que se está ensayando. Como alternativa, se puede ensayar la disminución en la formación de complejos entre el polipéptido PRO34128 y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está ensayando.

- 5 Por tanto, la presente invención proporciona métodos de selección de fármacos o de cualquier otro agente que pueda afectar a una enfermedad o trastorno asociada con el polipéptido PRO34128. Estos métodos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido PRO34128 o con un fragmento del mismo y ensayar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO34128 o el fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO34128 o el fragmento y la célula, por métodos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido PRO34128 o el fragmento normalmente está marcado. Después de una incubación adecuada, se separa el polipéptido PRO34128 o el fragmento libre del presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o sin formar complejos es una medida de la capacidad del agente particular de unirse al polipéptido PRO34128 o de interferir con el complejo de polipéptido PRO34128/célula.
- 10 Otra técnica para la selección de fármacos proporciona selección de alto rendimiento de fármacos que tienen afinidad de unión adecuada para un polipéptido y se describen en detalle en el documento WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Indicado de forma resumida, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos peptídicos pequeños de ensayo sobre un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Según se aplican a un polipéptido PRO34128, los compuestos peptídicos de ensayo se hacen reaccionar con el polipéptido PRO34128 y se lavan. El polipéptido PRO34128 unido se detecta por métodos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO34128 purificado también puede recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de selección de fármacos mencionadas anteriormente. Además, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.
- 15 Esta invención también contempla el uso de ensayos competitivos de selección de fármacos en que anticuerpos neutralizantes capaces de unirse al polipéptido PRO34128 compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión al polipéptido PRO34128 o a fragmentos del mismo. De este modo, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO34128.

Ejemplo 10: Diseño racional de fármacos

- El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales del polipéptido biológicamente activo de interés (es decir, un polipéptido PRO34128) o de moléculas pequeñas con las que interaccionarán, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos puede usarse para modelar fármacos que son más activos o formas estables del polipéptido PRO34128 o que potencian o interfieren con la función del polipéptido PRO34128 *in vivo* (c.f., Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)).

- En un enfoque, se determina la estructura tridimensional del polipéptido PRO34128 o de un complejo de polipéptido PRO34128-inhibidor, por cristalografía de rayos X, por modelado informático o, más normalmente, por una combinación de los dos enfoques. Debe averiguarse tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO34128 para dilucidar la estructura y para determinar el sitio o los sitios activos de la molécula. Menos frecuentemente, la información útil respecto a la estructura del polipéptido PRO34128 puede obtenerse por modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se usa para diseñar moléculas de tipo polipéptido PRO34128 análogas o para identificar inhibidores eficaces. Ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que tienen actividad o estabilidad mejorada como se muestra por Braxton y Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de polipéptidos nativos como se muestra por Athauda et al., J. Biochem., 113:742-746 (1993).

- También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado por ensayo funcional, como se describe anteriormente, y después resolver su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, produce un núcleo de fármaco sobre el cual puede basarse el diseño posterior del fármaco. Es posible evitar la cristalografía de proteínas totalmente generando anticuerpos anti-idiotipo (anti-id) contra un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como una imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión de los anti-id se esperaría que fuera un análogo del receptor original. Este anti-id después podría usarse para identificar y aislar péptidos de depósitos de péptidos producidos de forma química o biológica. Los péptidos aislados entonces actuarían como núcleos de fármaco.

- En virtud de la presente invención, puede hacerse que haya cantidades suficientes del polipéptido PRO34128 disponibles para realizar dichos estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO34128 proporcionado en este documento proporcionará directrices para los que emplean técnicas de modelado informático en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

Ejemplo 11: Distribución de la expresión tisular

- Se construyeron sondas oligonucleotídicas a partir de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido

PRO34128 mostrado en la Figura 1 para su uso en reacciones de amplificación por PCR cuantitativa. Las sondas oligonucleotídicas se eligieron para dar un fragmento amplificado de aproximadamente 200-600 pares de bases desde el extremo 3' de su molde asociado en una reacción convencional de PCR. Las sondas oligonucleotídicas se emplearon en reacciones convencionales de amplificación por PCR cuantitativa con bibliotecas de ADNc aisladas de diferentes fuentes de tejido adulto y/o fetal humano y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa para obtener una determinación cuantitativa del nivel de expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO34128 en los diversos tejidos ensayados. El conocimiento del patrón de expresión o la expresión diferencial del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO34128 en diversos tipos diferentes de tejido humano proporciona un marcador de diagnóstico útil para el tipado tisular, con o sin otros marcadores específicos de tejido, para determinar la fuente tisular principal de un tumor metastásico, diagnóstico de enfermedad y similares. Estos ensayos proporcionaron los siguientes resultados, y se muestran en la Figura 3A-B.

Molécula de ADN tejidos con expresión significativa (tejido normal)

ADN194917-3044 ADULTO (Figura 3A)-- Hígado adulto, intestino delgado adulto, pulmón adulto, páncreas adulto. FETAL (Figura 3B)-- Cerebro fetal, pulmón fetal, músculo esquelético fetal.

Molécula de ADN tejidos sin expresión significativa (tejido normal)

ADN 194917-3044 ADULTO (Figura 3A)-- Corazón adulto, cerebro adulto, placenta adulta, riñón adulto, páncreas adulto, próstata adulta, ovario adulto, colon adulto, timo adulto, músculo esquelético adulto, testículo adulto, PBL adulto. FETAL (Figura 3B)-- Hígado fetal, corazón fetal, bazo fetal, riñón fetal, timo fetal.

Molécula de ADN expresión en panel de tumores (datos no mostrados)

El ADN 194917-3044 se expresó en esófago normal, no se expresó en tumores esofágico; se expresó en estómago normal, no se expresó en tumor de estómago; no se expresó en riñón normal, no se expresó en tumor de riñón; se expresó en pulmón normal, no se expresó en tumor pulmonar; se expresó en recto normal, se expresó en tumor rectal; se expresó en hígado normal, no se expresó en tumor de hígado.

Ejemplo 12: Expresión de PRO34128 sobre la superficie celular

Se detectó la expresión de GFR α 1 marcado con FLAG (Figura 4A) y de PRO34128 marcado con FLAG (Figura 4B) en células COS-7 transfectadas de forma transitoria usando un anticuerpo anti-FLAG bioconjugado y estreptavidina conjugada a cy3. Los plásmidos que codifican GFR α 1 (Figura 4A) o PRO34128 con corte y empalme sobre la secuencia señal prepro-tripsina en el vector CMV-14 (Sigma) (Figura 4B) o el vector vacío (Figura 4C, D) se introdujeron por transfección en células COS-7 (1×10^5 células) en placas de 35 mm usando Eugene6™ (Roche Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se fijaron en 1 ml de paraformaldehído al 4 %, se tiñeron 48 horas después de la transfección durante 10 minutos y se incubaron en 1 ml de PBS que contenía suero de ternera al 5 % y 2 μ g de anticuerpo anti-FLAG-M2-biotina (Sigma) durante 1 hora. Las células después se lavaron 3 x con PBS y se incubaron durante 1 hora en 1 ml de PBS que contenía suero de ternera al 5 % y 10 μ g de estreptavidina-cy3 (Jackson Immunolabs). Las células se lavaron con PBS dos veces y se visualizó la tinción superficial en un microscopio Nikon TE300™ usando luz UV de la longitud de onda apropiada. Los resultados de este experimento demuestran que PRO34128 se expresa de forma eficaz y se localiza en la membrana celular.

Ejemplo 13: PRO34128 interacciona con RET

RET se descubrió por primera vez como un proto-oncogén (revisado en Airaksinen et al., (2002) Nat Rev Neurosci.(8) 383-394 y Takahashi M., (2001) Cytokine Growth Factor Rev. (12), 361-373). En su función normal, RET se activa solamente si se une a un miembro de la familia GFR. Estructuralmente, RET es una proteína transmembrana de un único dominio compuesta de cuatro repeticiones de tipo caderina en su dominio extracelular y su dominio intracelular contiene un dominio tirosina quinasa. La interacción de GDNF-GFR 1 con el ECD de RET conduce a autofosforilación del dominio tirosina quinasa de RET. Una vez fosforilados, los restos de tirosina en el dominio intracelular de RET actúan como sitios de acoplamiento de alta afinidad para otras proteínas de señalización intracelular tales como Shc, y facilitan la transducción de señales.

En este experimento, las células COS-7 transfectadas de forma transitoria con el plásmido que expresa PRO34128 se tiñeron con la proteína de fusión RET-Fc producida en células 293T. RET-Fc unido a las células se detectaba usando anticuerpo anti-Fc humano conjugado a biotina (Jackson Immuno labs) y estreptavidina conjugada a cy3 (Jackson Immunolabs). RET-Fc se preparó en células 293T introduciendo por transfección una construcción que expresaba RET-Fc bajo el control del promotor CMV usado Eugene6™ (Roche). El medio condicionado de las células transfectadas se recogió 48 horas después de la transfección y se usó como fuente de RET-Fc. Se transfectaron células COS-7 (1×10^5 células) en placas de 35 mm con el plásmido que expresa PRO34128 (Figura 5A-5B) o el vector vacío (Figura 5C, 5D) usando Eugene6™ (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El medio de las células COS-7 se reemplazó con medio condicionado que contenía RET-Fc durante 1 hora, 48 después de la transfección. Las células después se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en 1 ml de PBS que contenía suero de ternera al 5 % y 2 μ g de anticuerpo anti-Fc humano conjugado con biotina (Jackson Immunolabs).

durante 1 hora. Las células después se lavaron con PBS dos veces y se fijaron en 1 ml de paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos. Las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se incubaron con PBS que contenía suero de ternera al 5 % y 10 µg de estreptavidina-cy3 (Jackson Immunolabs). Las células se lavaron con PBS dos veces y se visualizó la tinción superficial en un microscopio Nikon TE300™ en presencia de luz UV, a la longitud de onda apropiada. La Figura 5A muestra que RET interacciona con PRO34128, y tiene el potencial de activar la transducción de señales intracelulares.

Ejemplo 14: PRO34128 se une al ligando GDNF

Se produjeron proteínas de fusión GFR1-Fc, GFR2-Fc, GFR3-Fc, GFR4-Fc y PRO34128-Fc introduciendo por transfección construcciones de expresión apropiadas usando Fugene6™ (Roche Biosciences). También se produjeron GDNF, NRTN, ARTN, PSPN y LEFTY-B marcados con FLAG de forma C-terminal en células 293T introduciendo por transfección la construcción de expresión apropiada en células 293T usando Fugene6™. Todas las construcciones de expresión están bajo el control del promotor CMV. El medio condicionado se recogió 48 horas después de la transfección y se mezclaron las proteínas de fusión con Fc apropiadas (como se indica en la Figura 6A) con los ligando y se inmunoprecipitaron los complejos de interacción usando perlas de proteína A (Sigma). Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en SDS-PAGE y se detectaron por transferencia de Western. Las proteínas marcadas con FLAG en co-precipitación se detectaron usando un anticuerpo anti-FLAG (Sigma) a una concentración final de 1 µg/ml, anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP (ICN Biosciences) y un sustrato quimioluminiscente (Amersham). GDNF marcado con FLAG se co-precipitó por GFR1-Fc y por PRO34128-Fc (Figura 6A - carriles 1, 5 respectivamente) lo que indica que PRO34128 interacciona con GDNF, un ligando conocido de GFR1, y no se detectó interacción con NRTN, ARTN y PSPN.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE. UU. (ATCC):

	Material	Dep. n.º ATCC	Fecha de depósito
	ADN 194917-3044	PTA-2985	30 de enero de 2001

Este depósito se hizo según las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con propósitos de procedimiento de patente y las regulaciones pertinentes (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. El depósito estará disponible en la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo del depósito al público tras petición de la patente de Estados Unidos pertinente o tras la apertura a inspección pública de cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o foránea, lo que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la descendencia a quien determine el comisionado de Estados Unidos de Patentes y Marcas facultado para ello de acuerdo con 35 USC §122 y la normativa del comisionado en virtud de ello (incluyendo 37 CFR §1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo en que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán lo antes posible tras notificación por otro igual. La disponibilidad del material depositado no se entiende como una licencia de poner en práctica la invención contraviniendo lo derechos garantizados según la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

La memoria descriptiva escrita anterior se considera suficiente para posibilitar a un experto en la materia poner en práctica la invención. La presente invención no debe limitarse en alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada está pretendida como una ilustración individual de ciertos aspectos de la invención. El depósito de material en este documento no constituye una admisión de que la descripción descrita en este documento contenida es inadecuada para posibilitar la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor de la misma, ni debe entenderse como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene:
5 (a) la secuencia de los restos de aminoácido de 1 a 394 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2); o
 (b) los restos de aminoácido 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido de 347-377 de la Figura 2.
- 10 2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de las posiciones de nucleótidos de 88 a 1269 de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1).
3. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de nucleótidos comprende:
15 (a) la secuencia de nucleótidos de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1);
 (b) la secuencia codificante de longitud completa de la secuencia de nucleótidos de la Figura 1 (SEQ ID NO: 1);
 (c) la secuencia codificante del polipéptido de longitud completa del ADNc de la proteína humana depositado en la ATCC con el n.º de depósito de la ATCC PTA-2985 (ADN194917-3044), o el complemento de la misma.
- 20 4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. El vector de la reivindicación 4, en el que dicha molécula de ácido nucleico está unida de forma funcional a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector.
- 25 6. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 4.
7. La célula hospedadora de la reivindicación 6, en donde dicha célula es una célula CHO.
8. La célula hospedadora de la reivindicación 6, en donde dicha célula es *E. coli*.
- 30 9. La célula hospedadora de la reivindicación 6, en donde dicha célula es una célula de levadura.
10. Un proceso para producir un polipéptido PRO34128 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 6 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido PRO34128 y recuperar dicho polipéptido PRO34128 de dicho cultivo celular.
- 35 11. Un polipéptido PRO34128 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene:
 (a) la secuencia de los restos de aminoácido de 1 a 394 de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2);
40 (b) los restos de aminoácido 1 a X de la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), donde X es cualquier aminoácido de 347-377 de la Figura 2; o
 (c) la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del vector depositado en la ATCC con el n.º de acceso PTA-2985 (ADN194917-3044).
- 45 12. Una molécula quimérica que comprende un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 11 fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.
13. La molécula quimérica de la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una secuencia de marca de epítopo.
- 50 14. La molécula quimérica de la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una región Fc de una inmunoglobulina.
15. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 11.
- 55 16. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
17. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 60 18. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
19. Un agonista de un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 11, en el que dicho agonista es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a dicho polipéptido PRO34128.
- 65 20. Un agonista de un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 11, en el que dicho antagonista es (a) un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a dicho polipéptido PRO34128, o (b) un oligonucleótido

antisentido o con sentido que inhibe la expresión de dicho polipéptido PRO34128.

21. Una composición de materia que comprende (a) un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 11, (b) un agonista de un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 19, (c) un antagonista de un polipéptido PRO34128 como se define en la reivindicación 20 o (d) un anticuerpo anti-PRO34128 como se define en la reivindicación 15, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5

FIGURA 1

TTATTCTGGACAGTTACTCTTAAGAAAGTTGTCAGAAGAAACGCATCTGCCTTTTTTTTC
 CAGGTGAACTGCCGTGAGTTGTCCAGCATGATAGTGTATTATTTCTTGGCTATGGGGTTA
 AGCTTGGAATGAATACACTTCCCAAACCAATAATTGCACATATTTAAGAGAGCAATGC
 TTACGTGATGCAAATGGATGTAAACATGCTTGGAGAGTAATGGAAGATGCCTGCAATGAT
 TCAGATCCAGGTGACCCCTGCAAGATGAGGAATTCATCATACTGTAACTGAGTATCCAG
 TACTTAGTGGAAAGCAATTTCCAATTTAAAGAGTGTCTTTGCACTGATGACTTCTATTGT
 ACTGTGAACAACTGCTTGGAAAAAATGTATCAATAAATCAGATAACGTGAAAGAGGAT
 AAATTCAAATGGAATCTAACTACACGTTCCCATCATGGATTCAAAGGGATGTGGTCCTGT
 TTGGAAGTGGCAGAGGCATGTGTAGGGGATGTGGTCTGTAATGCACAGTTGGCCTCTTAC
 CTTAAAGCTTGCTCAGCAAATGGAAATCCGTGTGATCTGAAACAGTGCCAAGCAGCCATA
 CGGTTCTTCTATCAAAATATACCTTTTAAACATTGCCCAGATGTTGGCTTTTTTGTGACTGT
 GCTCAATCTGATATACCTTGTGAGCAGTCAAAGAAGCTCTTCACAGCAAGACATGTGCA
 GTGAACATGGTTCCACCCCTACTTGCCTCAGTGTAAATTCGCAGCTGCCAAAATGATGAA
 TTATGCAGGAGGCACTATAGAACATTTAGTCAAATGCTGGCAGCGTGTGACTAGAAAG
 TGCCATGAAGATGAGAATTGCATTAGCACCTTAAGCAAACAGGACCTCACTTGTTTCAGGA
 AGTGATGACTGCAAAGCTGCTTACATAGATATCCTTGGGACGGTCCTTCAAGTGCAATGT
 ACCTGTAGGACCATTACACAAAGTGAGGAATCTTTGTGTAAGATTTTCCAGCACATGCTT
 CATAGAAAATCATGTTTCAATTATCCAACCCTGTCTAATGTCAAAGGCATGGCATTTGTAT
 ACAAGAAAACATGCAAACAAATCACTTTAACTGGATTTCATTCCCCCTTCAATGGAGAA
 GTAATCTATGCTGCCATGTGCATGACAGTCACCTGTGGAATCCTTCTGTTGGTTATGGTC
 AAGCTTAGAACTTCCAGAATATCAAGTAAAGCAAGAGATCCTTCACCGATCCAAATACCT
 GGAGAACTCTGATTTCATTAGGAGTCATGGACCTATAACAATCACTCTTTTCTCTGCTTTT
 CTTCTTTCTCTTTTCTTCTCTTCTCTCCTCTCCTCTCTTCTCCTCTCCTCCCCCTCCCCCT
 CTCTGTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTGTGGTGGAGTTTGTCTTTGTTGCCAG
 GCTGCAGTACAATGGCTCAATCTCGGTTCACTGCAACCTCTGCCTCCAAGGTTCAAGTGA
 TTTTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTACCCGCCACCACGCCAGCT
 AATTTTTTTGTATTTTGTAGTAGAGATGGGGTTTTGCCAAATTGGCCAGGGTGGTCTCAA
 CTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCACCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTG
 AGCAACCACGTCAAGACAACAATCACTTTCTTTAAAGCAAATCCTACAGCTGGTCAACAC
 ACTATTCCATCTGTATCGAGAAAGAAAATGTTAAAATAGACTTAAAAATATTGCTTTGT
 TACATATAATAATATGGCATGATGATTATTTTTTTCTTAATACTCAAGAAAAATATAT
 GGTGGTATCTTTTACAACACTGGAACAGAAATAAAGTTTCCCTTGAAGGC

FIGURA 2

MIVFIFLAMGLSLENEYTSQTNNTYLREQCLRDANGCKHAWRVMEDACNDSDPGDPCKM
RNSSYCNLSIQYLVESNFQFKECLCTDDFYCTVNKLLGKKCINKSDNVKEDKFKWNLTR
SHHGFKGMWSCLEVAEACVGDVVCNAQLASYLKACSAANGNPCDLKQCQAAIRFFYQNI
NIAQMLAFCDCAQSDIPCQQSKEALHSKTCAVNMVPPPTCLSVIRSCQNDLCRRHYRTF
QSKCWQRVTRKCHEDENCISTLSKQDLTCSGSDCKAAYIDILGTVLQVQCTCRTITQSE
ESLCKIFQHMLHRKSCFNYPTLSNVKGMALYTRKHANKITLTGFHSPFNGEVIYAAMCMT
VTCGILLLLVMVKLRTSRISSKARDPSPPIQIPGEL

Dominio transmembrana:

349-373

Sitio de N-glucosilación.

23-26

50-53

62-65

67-70

103-106

116-119

Sitio de N-miristoilación.

37-42

127-132

271-276

Sitio de amidación.

97-100

Familia del receptor de GDNF

1-328

FIGURA 3

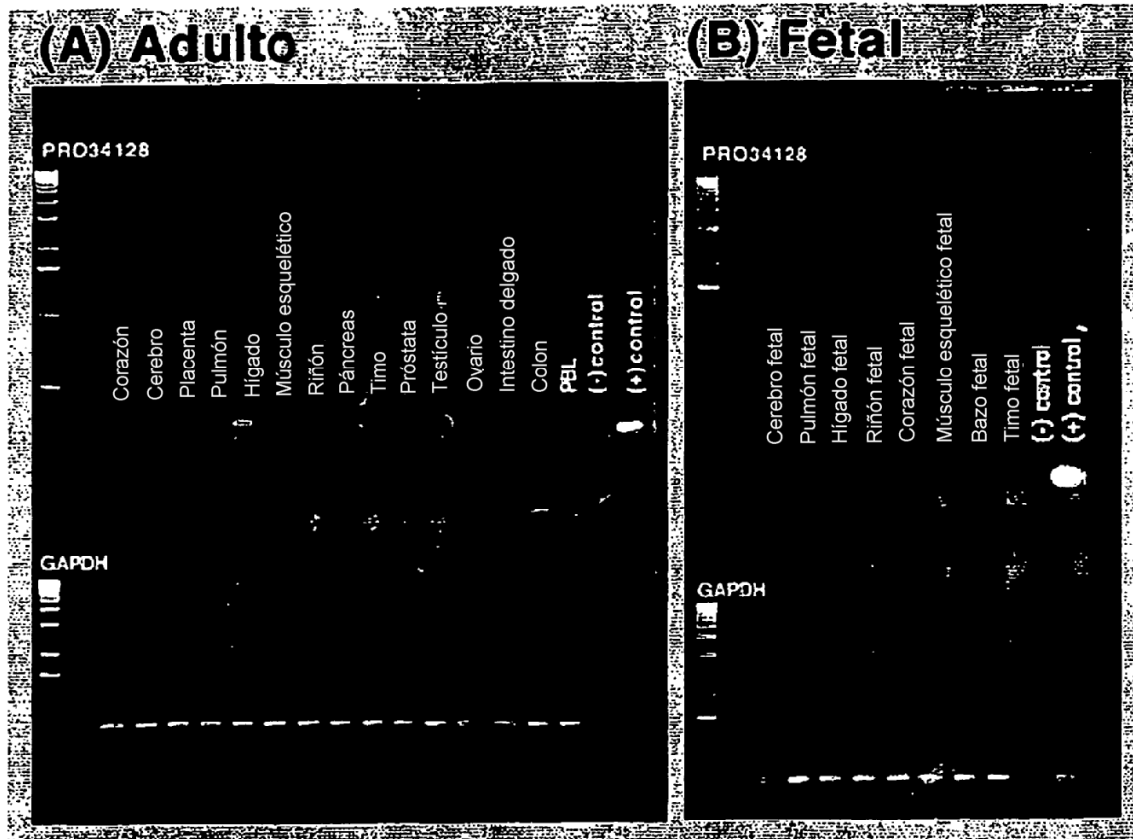


FIGURA 4

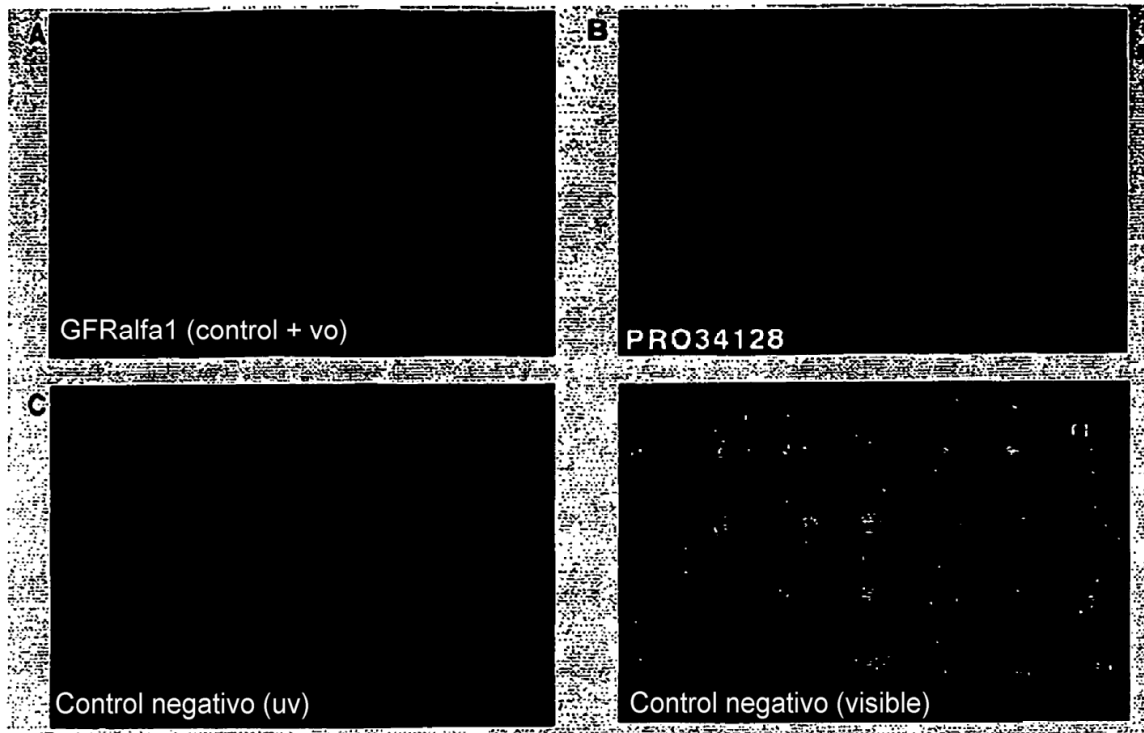


FIGURA 5

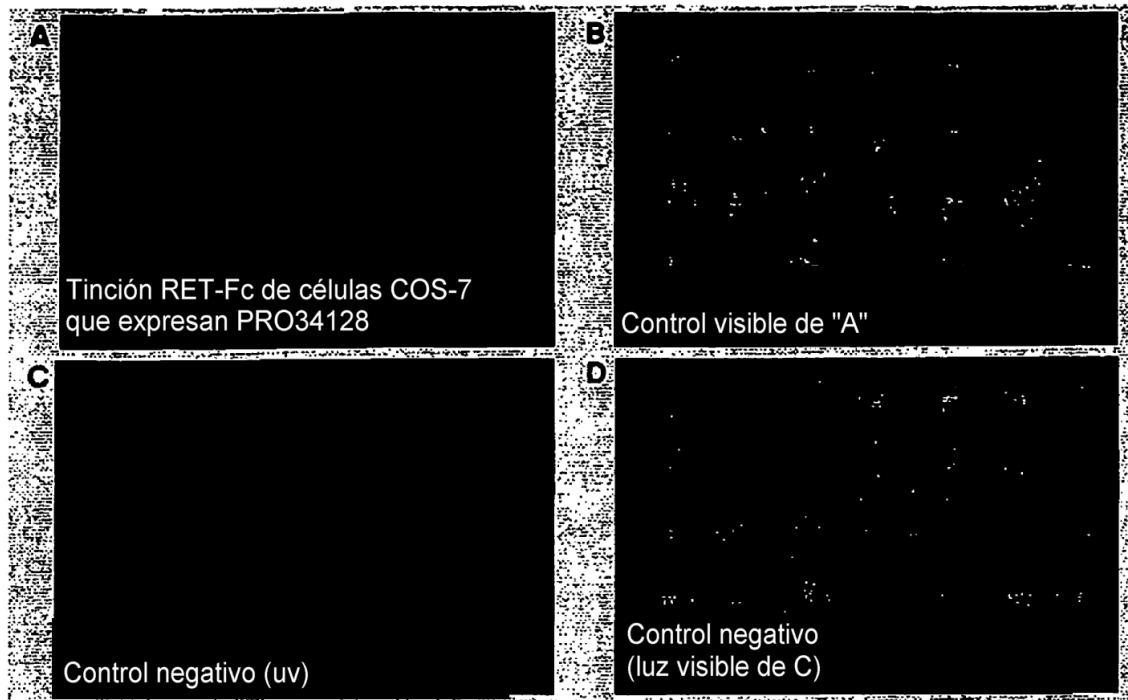


FIGURA 6

