



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 896**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **93920446 .7**

86 Fecha de presentación : **01.09.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **0662077**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.1995**

54

Título: **Ligando de CD27.**

30

Prioridad: **08.09.1992 US 941648**
13.08.1993 US 106507

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73

Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72

Inventor/es: **Beckmann, M, Patricia;**
Goodwin, Raymond, G.;
Giri, Judith, G. y
Armitage, Richard, J.

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 281 896 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

Ligando de CD27.

5 **Antecedentes de la invención**

El antígeno de linfocitos CD27 es un receptor de citoquina encontrado en la superficie de la mayoría de los linfocitos T y algunos linfocitos B humanos. Se ha aislado un cDNA que codifica el receptor CD27 (Camerini y otros, *J. Immunol.* 147:3165, (1991). Basándose en la secuencia polipeptídica predicha, CD27 pertenece a una familia de receptores ricos en cisteína cuyos ligandos conocidos incluyen factor de crecimiento nervioso y TNF- α y - β . Las similitudes estructurales sugieren que CD27 pertenece a un subgrupo específico de linfocitos de la familia comprendida por el Ag CD40 de células B, el subgrupo Ag OX40 de células T de rata y el Ag 4-1BB de activación de células T de ratón. Se cree que el receptor CD27 media en las funciones que permiten la supervivencia de células activadas.

El factor de crecimiento responsable de la unión a y la iniciación de actividades de CD27 todavía no se ha identificado. La existencia y la naturaleza de tales factores de crecimiento serán importantes para elucidar los mecanismos para la supervivencia de células activadas. Ha existido así una necesidad de identificar y caracterizar un ligando que se une a CD27. Camerini y otros (*J. Immunology*, 147, 3165-3169 (1991)) describen una caracterización de CD27. Armitage y otros (*Nature* 1992, 357, 80-82) describen la clonación y la caracterización del ligando para el receptor CD40 en ratones. WO 94/10308 trata de una proteína de fusión que comprende una cremallera de leucina y un dominio extracelular de una proteína de membrana de mamífero tal como CD40L, CD27L, OX40L o TNF. Val Lier y otros (*European Journal of Immunology*, 1988, 18, 811-816) describen anticuerpos que se unen a CD27.

Stein y otros (*Leucocyte IV*, 1989, 446-455) describe un informe agrupado relativo a CDw70. Hintzen y otros (*International Immunology*, 1994, 6, 477-480) se refieren al descubrimiento de que CD70 representa el ligando humano para CD27. Paloczi y otros (*Haematologia*, 1991, 24, 83-90) describen el patrón de la expresión de antígeno de activación sobre la subpoblación de linfocitos T en la mononucleosis infecciosa. Paloczi (*Leukaemia and Lymphoma*, 1990, 3, 31-36) describe la detección de antígenos de activación sobre células de leucemia linfocítica crónica. Pileri (*Histopathology*, 1990, 16, 383-391) describe el linfoma de células T linfotiohistiocítico.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un nuevo ligando de CD27 (CD27L) que se une al receptor CD27. La presente invención también proporciona DNA aislado que codifica la proteína de CD27L, vectores de expresión que comprenden el DNA aislado y un método para producir CD27L cultivando células huésped que contienen los vectores de expresión bajo condiciones apropiadas para la expresión de la proteína de CD27L. También se describen anticuerpos dirigidos contra la proteína de CD27L o uno de sus fragmentos inmunogénicos.

CD27L estimula la proliferación de células T de sangre periférica humana purificadas, como se describe con detalle en el Ejemplo 8A. Células T purificadas (1×10^5 /pocillo) se cultivaron con una concentración de células CV-1/EBNA fijadas que se transfectaron bien con vector vacío o bien con vector que expresa CD27L durante 3 días en presencia de una concentración subóptima de PHA (0,1%). Durante las 8 horas finales de cultivo las células se sometieron a impulsos con ^3H -timidina y se determinó la incorporación. Se determinaron los cpm medios \pm DE de cultivos por triplicado. Las células que expresan CD27L proliferan hasta una extensión mayor que las células que expresan vector vacío.

Células T CD4⁺ o CD8⁺ purificadas (1×10^5 /pocillo) se cultivaron en IL-2 (10 ng/ml) o células CV-1/EBNA que expresan CD27L (1×10^4 /pocillo) durante 3 días con PHA subóptima. Las células se cultivaron bien con o bien sin un antisuero de IL-2 neutralizador. Para células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ CD27L estimulaba la proliferación de una manera independiente de IL-2.

CD27L induce células T citolíticas (según se describe con detalle en el Ejemplo 8B). Células T purificadas se cultivaron en medio solo, en medio más IL-2 o con células CV-1/EBNA transfectadas con vector vacío o con vector que expresa CD27L bien en ausencia o bien en presencia de una concentración subóptima de PHA (0,1%). Después de 4 días, las células se recuperaron y se ensayaron por duplicado con respecto a la actividad citolítica frente a dianas P815 marcadas con ^{51}Cr en presencia de PHA (0,6%). Las células que expresaban CD27L no tenían efecto estimulante sobre la actividad citolítica en ausencia de coestimulación. En contraste, las células que expresan CD27L que se coestimulaban con PHA potenciaban la generación de células citolíticas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de CD27L se describe con detalle en el Ejemplo 7. Células MP-1 y CV-1/EBNA transfectadas con vector vacío o vector que expresa CD27L se marcaron superficialmente con ^{125}I -sodio. Los lisados se precipitaron a continuación con CD27/Fc seguido por proteína G-Sepharose y se analizaron sobre SDS-gel de poliacrilamida (al 4%-20%) bajo condiciones reductoras. La especie proteínica predominante sobre células CV-1/EBNA que expresan tanto MP-1 como CD27L tenía un M_r aparente de aproximadamente 50.000.

Descripción detallada de la invención

Un cDNA que codifica un nuevo ligando proteínico para el antígeno de activación de células T CD27 se ha aislado de acuerdo con la presente invención. También se proporcionan vectores de expresión que comprenden el cDNA de ligando de CD27 (CD27L) y métodos para producir polipéptidos de CD27L recombinantes cultivando células huésped que contienen los vectores de expresión bajo condiciones apropiadas para la expresión de CD27L, y recuperar el CD27L expresado. La proteína de CD27L purificada también es abarcada por la presente invención.

La presente invención también proporciona CD27L o sus fragmentos antigénicos que pueden actuar como inmunógenos para generar anticuerpos específicos para los inmunógenos de CD27L. Pueden así prepararse anticuerpos monoclonales específicos para CD27L o sus fragmentos antigénicos.

La nueva citoquina descrita aquí es un ligando para CD27, un receptor que es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF/NGF. Por lo tanto, se cree que CD27L es el ligando que inicia la señal biológica mediada por CD27, que se sabe que se expresa sobre la superficie de la mayoría de las células T y algunas células B. Un uso del ligando de CD27 de la presente invención es como una herramienta de investigación para estudiar el papel de CD27L en la supervivencia de células activadas. Los polipéptidos de CD27L de la presente invención también pueden emplearse en ensayos *in vitro* para la detección de CD27 o CD27L o sus interacciones. Se ha mostrado que CD27L induce la proliferación de células T coestimuladas y mejora la generación de células T citolíticas, sugiriendo que CD27L representa un papel en la maduración de células T. Estudios biológicos del CD27L de la presente invención (según se describe en los Ejemplos 6, 8 y 10) muestran que CD27L coestimula la proliferación de células T y también potencia la generación de precursores de células T citolíticas.

El término "CD27L", según se usa aquí, se refiere a un género de polipéptidos que son capaces de unirse a CD27. CD27L humano está dentro del alcance de la presente invención, como también proteínas de CD27L derivadas de otras especies de mamíferos. Según se usa aquí, el término "CD27L" incluye proteínas unidas a la membrana (que comprenden un dominio citoplásmico, una región de transmembrana y un dominio extracelular) así como proteínas truncadas que retienen la propiedad de unión a CD27. Tales proteínas truncadas incluyen, por ejemplo, CD27L soluble que comprende solo el dominio extracelular (unión al receptor). La secuencia de cDNA y la secuencia de aminoácidos predicha de CD27L se indican en el N° ID SEC: 1 y el N° ID SEC: 2.

El aislamiento de un cDNA que codifica CD27L humano se describe en los Ejemplos 1-4 posteriores. Una proteína de fusión CD27/Fc humana se preparó como se describe en el Ejemplo 1 para el uso en clones de rastreo en un procedimiento de clonación por expresión directa, para identificar los que expresan una proteína que se une a CD27.

Cualquiera de las líneas celulares que demuestran unión de CD27 a CD27L puede usarse como una fuente de ácido nucleico en un intento de aislar una secuencia de DNA que codifica CD27L. Una biblioteca de cDNA puede prepararse, por ejemplo, a partir de la línea celular U937, la línea celular monocítica THP-1, la línea celular de leucemia linfoblástica pre-B temprana EU-1, células T tonsilares purificadas o células MP-1, y rastrear para identificar cDNA de CD27L usando la estrategia de clonación por expresión directa descrita posteriormente. Las células pueden derivarse de fuentes humanas, murinas u otras fuentes mamíferas, incluyendo, pero no limitadas a, células de rata, bovinas, porcinas o de diversos primates.

Brevemente, RNA total se extrajo de células MP-1 y se enriqueció con respecto a RNA de poli(A)+ mediante cromatografía con oligo(dT)-celulosa, esencialmente como se describe por Ausubel y otros, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1 (1987). Se preparó cDNA de la primera hebra usando el RNA total como plantilla. DNA que codifica el dominio extracelular de CD27 humano se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores basados en la secuencia de CD27 humano publicada por Camerini y otros, anteriormente, y el fragmento de DNA amplificado se aisló. Un vector de expresión que comprende el DNA del dominio extracelular de CD27 fusionado en el marco al extremo N de una secuencia de DNA de la región Fc de IgG1 humana se construyó y se transfirió a células de mamífero. La proteína expresada se purificó mediante un procedimiento que implicaba el uso de una columna de proteína G (a la que se une la porción Fc de la proteína de fusión).

La línea de células B humanas MP-1 que expresa CD27L se identificó usando un ensayo de rastreo en dos etapas en el que la proteína de fusión CD27/Fc se unía a células que tenían CD27L, seguido por ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón unido a la porción Fc de la proteína de fusión CD27/Fc. Se preparó una biblioteca de cDNA a partir de la línea de células B humanas transformadas con EBV MP-1. cDNA de esta biblioteca (en un vector de expresión de mamífero que también se replica en *E. coli*) se transfirió en células CV-1/EBNA-1 (mamíferas), para el aislamiento de clones que expresan una proteína que se une a CD27 usando una técnica de clonación por expresión directa. Los clones se rastrearon usando el método de rastreo en dos etapas que implica la proteína de fusión CD27/Fc unida a células, seguido por ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón unido a la porción Fc de la proteína de fusión CD27/Fc. El vector recombinante aislado del clon positivo (cDNA de CD27L murino en el plásmido pDC303) se transformó en células de *E. coli*, se depositó en the American Type Culture Collection el 18 de agosto de 1992, y se le asignó en N° de registro ATCC 69052. El depósito se realizó bajo los términos del Tratado de Budapest.

El análisis de la secuencia del clon resultante revelaba un inserto de 813 pb en un marco de lectura abierto largo simple capaz de codificar una proteína de 193 aminoácidos. Los 20 aminoácidos aminoterminales estaban seguidos por 18 aminoácidos hidrófobos (aminoácidos 21-38) que presumiblemente funcionan como un anclaje de transmembrana.

ES 2 281 896 T3

Esta falta de una secuencia de señal, la presencia de un dominio hidrófobo interno y la presencia de dos sitios de glicosilación potenciales conectados por N (aminoácidos Asn⁶³ y Asn¹⁷⁰) en el dominio C-terminal sugería que CD27L es una proteína de transmembrana tipo II que tiene un dominio carboxiterminal extracelular.

5 El clon de cDNA originalmente aislado contenía solo 37 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación supuesto (empezando en el nucleótido 114 del N° ID SEC: 1) sin codones de terminación en el marco. Además, la secuencia alrededor de este sitio de iniciación no está de acuerdo con el consenso para tales sitios descrito por Kozak, *Nucl. Acids. Res.* 12:857 (1984). Así, se realizó una reacción de “PCR anclada” (según se describe por Carrier y otros, *Gene* 116:173 (1992)) para clonar el extremo 5' del transcrito de CD27L para asegurar que no existía un sitio de iniciación
10 aguas arriba. Esto daba como resultado la identificación de 113 nucleótidos adicionales (nucleótidos 1-113 del N° ID SEC: 1) que precedían al extremo del clon originalmente aislado. No se encontraron sitios de iniciación aguas arriba del que se identificaba previamente.

15 El cDNA de CD27L humano puede radiomarcarse y usarse como una sonda para aislar otros cDNAs de CD27L de mamífero mediante hibridación de especies cruzadas. Por ejemplo, una biblioteca de cDNA preparada a partir de linfocitos de sangre periférica mûridos activados puede rastrearse con cDNA humano radiomarcado para aislar un clon positivo.

20 Aunque se empleó una proteína de fusión CD27/Fc en el procedimiento de rastreo descrito en el Ejemplo 4 posteriormente, puede usarse CD27 marcado para rastrear clones y posibles líneas celulares para la expresión de proteínas de CD27L. Sin embargo, la proteína de fusión CD27/Fc ofrece la ventaja de purificarse fácilmente. Además, se forman enlaces disulfuro entre las regiones Fc de dos cadenas de la proteína de fusión separadas, creando dímeros. El receptor de CD27/Fc dímero se eligió por la ventaja potencial de una unión de afinidad superior del ligando de CD27, en vista de la posibilidad de que el ligando que se buscaba fuera multímero.

25 Además, otras proteínas de fusión adecuadas que comprenden CD27 pueden substituir a CD27/Fc en los procedimientos de rastreo. Otras proteínas de fusión pueden elaborarse fusionando una secuencia de DNA para el dominio de unión al ligando de CD27 a una secuencia de DNA que codifica otro polipéptido que es capaz de purificación por afinidad, por ejemplo avidina o estreptavidina. La construcción génica resultante puede introducirse en células de mamífero para expresar una proteína de fusión. Las proteínas de fusión receptor/avidina pueden purificarse mediante
30 cromatografía de afinidad a biotina. La proteína de fusión puede recuperarse más tarde de la columna eluyendo con una solución altamente salina u otro tampón apropiado. Otras regiones Fc de anticuerpo pueden substituir a la región Fc de IgG1 humana descrita en el Ejemplo 1. Otras regiones Fc adecuadas son aquellas que pueden unirse con alta afinidad a la proteína A o la proteína G e incluyen la región Fc de IgG1 mûrida o fragmentos de la región Fc de IgG1 humana, por ejemplo, fragmentos que comprenden al menos la región bisagra de modo que se formarán enlaces disulfuro intercatenarios.

35 cDNA que codifica un polipéptido de CD27L puede aislarse de otras especies de mamífero usando los métodos descritos en los Ejemplos. Por ejemplo, una biblioteca de cDNA mûrido puede substituir a la biblioteca de cDNA humano que se rastreó con respecto a la unión de la proteína de fusión CD27/Fc humana radioyodada en el procedimiento de clonación por expresión directa descrito en el Ejemplo 4. Pueden así identificarse clones que expresan otras proteínas de CD27 de mamífero. Tipos celulares a partir de los cuales pueden prepararse bibliotecas de cDNA pueden elegirse mediante el procedimiento de unión en dos etapas descrito en el Ejemplo 2, o cualquier otra técnica adecuada. Alternativamente, mRNAs aislados de diversas líneas celulares pueden rastrearse mediante hibridación Northern
45 para determinar una fuente adecuada de mRNA de CD27L de mamífero para el uso en la clonación de un gen de CD27L.

50 Alternativamente, pueden utilizarse los cDNAs de CD27L humanos descritos aquí para rastrear cDNA derivado de otras fuentes de mamífero con respecto a cDNA de CD27L usando técnicas de hibridación de especies cruzadas bien conocidas. Brevemente, una sonda oligonucleotídica basada en la secuencia de nucleótidos de la región de codificación (preferiblemente la región extracelular) del clon mûrido o humano se prepara mediante técnicas estándar. La sonda mûrida o humana se usa para rastrear una biblioteca de cDNA de mamífero o una biblioteca genómica, generalmente bajo condiciones moderadamente restrictivas.

55 Una modalidad de la presente invención proporciona polipéptidos de CD27L solubles. Los polipéptidos de CD27L solubles comprenden la totalidad o parte del dominio extracelular de un CD27L natural pero carecen de la región de transmembrana que provocaría la retención del polipéptido sobre una membrana celular. CD27L soluble se secreta así durante la expresión. Los polipéptidos de CD27L soluble que pueden emplearse retienen la capacidad para unirse al receptor CD27. El CD27L soluble también puede incluir parte de la región de transmembrana o parte del dominio
60 citoplásmico u otras secuencias, con tal de que la proteína de CD27L soluble sea capaz de secretarse.

65 CD27L soluble puede identificarse (y distinguirse de sus homólogos unidos a la membrana no solubles) separando células intactas que expresan la proteína deseada del medio de cultivo, por ejemplo mediante centrifugación, y ensayando el medio (sobrenadante) con respecto a la presencia de la proteína deseada. El medio de cultivo puede ensayarse usando procedimientos que son similares o idénticos a los descritos en los ejemplos posteriores. La presencia de CD27L en el medio indica que la proteína se secretaba de las células y es así una forma soluble de la proteína deseada. CD27L soluble también puede ser una forma presente en la naturaleza de esta proteína.

El uso de formas solubles de CD27L es ventajoso para ciertas aplicaciones. La purificación de las proteínas procedentes de células huésped recombinantes se facilita, ya que las proteínas solubles se secretan de las células. Además, las proteínas solubles son generalmente más adecuadas para la administración intravenosa.

5 Formas solubles de proteínas de CD27L también pueden prepararse sometiendo a delección los dominios de membrana y citoplásmico y añadiendo un péptido de señal apropiado para permitir la secreción de la forma soluble de la proteína (Smith y otros, *Science* 238:1704, 1987; Treiger y otros, *J. Immunol.* 136:4099, 1986). Polipéptidos de CD27L solubles incluyen los que comprenden el dominio extracelular total o parcial de una proteína de CD27L natural. CD27L truncado, incluyendo los polipéptidos solubles, puede prepararse mediante cualquiera de un número
10 de técnicas convencionales. En el caso de las proteínas recombinantes, un fragmento de DNA que codifica un fragmento deseado puede subclonarse en un vector de expresión. Alternativamente, una secuencia de DNA deseada puede sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas. También pueden producirse fragmentos de DNA mediante digestión con endonucleasas de restricción de una secuencia de DNA clonada de longitud completa, y aislarse mediante electroforesis sobre geles de agarosa. Pueden emplearse conectores que contienen un sitio o sitios de segmentación
15 con endonucleasas de restricción para insertar el fragmento de DNA deseado en un vector de expresión, o el fragmento puede digerirse en sitios de fragmentación presentes naturalmente en el mismo. También puede emplearse el bien conocido procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa para aislar una secuencia de DNA que codifica un fragmento proteínico deseado.

20 En otro sistema, puede emplearse un tratamiento enzimático (por ejemplo, usando exonucleasas Bal 31) para someter a delección nucleótidos terminales de un fragmento de DNA para obtener un fragmento que tiene un extremo deseado particular. Entre los conectores disponibles comercialmente están aquellos que pueden ligarse a los extremos romos producidos por la digestión con Bal 31, y que contienen un sitio o sitios de segmentación con endonucleasas de restricción. Alternativamente, pueden sintetizarse oligonucleótidos que reconstruyen el extremo N o C de un fragmento
25 de DNA hasta un punto deseado. El oligonucleótido puede contener un sitio de segmentación con endonucleasas de restricción aguas arriba de la secuencia de codificación deseada y situar un codón de iniciación (ATG) en el extremo N de la secuencia de codificación.

Las proteínas de CD27L solubles también pueden expresarse como proteínas de fusión en las que el dominio extracelular de la proteína de membrana está ligado a una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Fanslow y otros, *J. Immunol.* 149:65, 1992; Noelle y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6550, 1992) para crear una molécula de CD27L soluble dímera, o pueden fusionarse con el dominio extracelular del antígeno CD8 de linfocitos T murinos (Hollenbaugh y otros, *EMBO J.* 11:4313, 1992).

35 Múltiples moléculas de CD27L solubles también pueden oligomerizarse. Un método preferido para crear formas multímeras de CD27L es usar una cremallera de leucina, que es un motivo de héptada de aminoácidos repetitivo presente como un dominio conservado en ciertas proteínas naturales. La cremallera de leucina contiene de 4 a 5 residuos de leucina intercalados con otros aminoácidos que se pliegan como espirales superenrolladas paralelas cortas y provocan la oligomerización de las proteínas a las que se fusionan (O'Shea y otros, *Science* 254:539, 1991). La arquitectura general de la espiral superenrollada paralela se ha caracterizado bien, con un empaquetamiento de "nudos en agujeros" como el propuesto por Crick en 1953 (*Acta Crystallogr.* 6:689). Los dímeros formados por un dominio de cremallera de leucina se estabilizan mediante la repetición heptádica, denominada $(abcdefg)_n$, de acuerdo con la notación de McLachlan y Stewart (*J. Mol. Biol.* 98:293, 1975), en la que los residuos a y d son generalmente residuos hidrófobos, siendo d una leucina, que se alinean en la misma cara de una hélice. Residuos cargados opuestamente
40 se presentan comúnmente en las posiciones g y e. Así, en una espiral superenrollada paralela formada a partir de dos dominios de cremallera de leucina helicoidales, los "nudos" formados por las cadenas laterales hidrófobas de la primera hélice se empaquetan en los "agujeros" formados entre las cadenas laterales de la segunda hélice.

Los residuos de leucina en la posición d contribuyen a energías de estabilización hidrófoba grandes, y son importantes para la formación de dímeros (Krystek y otros, *Int. J. Peptide Res.* 38:229, 1991). Lovejoy y otros presentaron recientemente la síntesis de un haz helicoidal a de triple hebra en el que las hélices se sitúan arriba-arriba-abajo (*Science* 259:1288, 1993). Sus estudios confirmaron que la energía de estabilización hidrófoba proporciona la principal fuerza conductora para la formación de espirales superenrolladas a partir de monómeros helicoidales y que las interacciones electrostáticas contribuyen a la estequiometría y la geometría de espirales superenrolladas.
55

Secuencias de cremallera de leucina derivadas de las proteínas *fos* y *jun* pueden usarse en la formación de proteínas de fusión biespecíficas, según se describe por Kostelny y otros, *J. Immunol.* 148:1547, 1992; O'Shea y otros, *Science* 245: 646, 1989 y Turner y Tjian, *Science* 243:1689, 1989. También se encuentran dominios de cremallera de leucina en el factor de transcripción de levadura GCN4 y una proteína de unión a DNA termoestable encontrada en hígado de rata (C/EBP; Landschulz y otros, *Science* 243:1681, 1989). Las proteínas fusogénicas de varios virus diferentes, incluyendo paramixovirus, coronavirus, virus del sarampión y muchos retrovirus, también poseen motivos de cremallera de leucina (Buckland y Wild, *Nature* 338:547, 1989; Britton, *Nature* 353:394, 1991; Delwart y Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:703, 1990). Los dominios de cremallera de leucina en estas proteínas virales fusogénicas están cerca de la región de transmembrana de las proteínas, donde los motivos de cremallera de leucina pueden contribuir a
65 la estructura oligómera de las proteínas fusogénicas.

Varios estudios han indicado que los residuos de leucina individuales pueden substituirse por aminoácidos conservativos con disminución mínima en la capacidad para dimerizarse. van Heekeren y otros presentaron que un número

de diferentes residuos de aminoácidos puede substituir a los residuos de leucina en el dominio de cremallera de leucina de GCN4, y que algunas proteínas de GCN4 que contienen dos substituciones de leucina eran débilmente activas (*Nucl. Acids Res.* 20:3721, 1992). Las substituciones de aminoácidos en los residuos a y d de un péptido sintético que representa el dominio de cremallera de leucina de GCN4 también pueden cambiar la oligomerización de dominios de cremallera de leucina (Alber, Sixth Symposium of the Protein Society, San Diego, CA). Cuando todos los residuos en la posición a se cambian por isoleucina, la cremallera de leucina todavía forma un dímero paralelo. Cuando, además de este cambio, todos los residuos de leucina en la posición d también se cambian por isoleucina, el péptido resultante forma espontáneamente una espiral superenrollada paralela trómera en solución. Substituir todos los aminoácidos en la posición d por isoleucina y en la posición a por leucina da como resultado un péptido que se tetrameriza.

La presente invención proporciona polipéptidos de CD27L purificados, tanto recombinantes como no recombinantes. Variantes y derivados de proteínas de CD27L naturales que retienen la actividad biológica deseada también están dentro del alcance de la presente invención. Las variantes de CD27L pueden obtenerse mediante mutaciones de secuencias de nucleótidos que codifican para polipéptidos de CD27L naturales. Una variante de CD27L, según se menciona aquí, es un polipéptido substancialmente homólogo a CD27 natural, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la del CD27L natural (ser humano, murino u otras especies mamíferas) debido a una o más deleciones, inserciones o substituciones.

La secuencia de aminoácidos variante es preferiblemente al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos de CD27L natural, lo más preferiblemente al menos 90% idéntica. El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencias usando el programa informático GAP, versión 6.0, descrito por Devereux y otros (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) y disponible de the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), según se revisó por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math* 2:482, 1981). Brevemente, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos (es decir, nucleótidos o aminoácidos) alineados que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, según se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos extremos.

Pueden efectuarse alteraciones de la secuencia de aminoácidos natural mediante cualquiera de un número de técnicas conocidas. Pueden introducirse mutaciones en loci particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia natural. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, substitución o deleción de aminoácidos deseada.

Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específica para el sitio dirigida a oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la substitución, deleción o inserción requerida. Métodos ejemplares para realizar las alteraciones indicadas anteriormente son descritos por Walder y otros (*Gene* 42:133, 1986); Bauer y otros (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero de 1985, 12-19); Smith y otros (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981) y las Patentes de EE.UU. N° 4.518.584 y 4.737.462, que se incorporan en la presente mediante referencia.

Las variantes pueden comprender secuencias conservativamente substituidas, lo que significa que un residuo de aminoácido dado se reemplaza por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Ejemplos de substituciones conservativas incluyen la substitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o substituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp o Gln y Asn. Otras de tales substituciones conservativas, por ejemplo substituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobia similares, son bien conocidas.

CD27L también puede modificarse para crear derivados de CD27L formando conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Los derivados covalentes de CD27L pueden prepararse conectando los restos químicos a grupos funcionales en cadenas laterales de aminoácidos de CD27L o en el extremo N o el extremo C de un polipéptido de CD27L o su dominio extracelular. Otros derivados de CD27L dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de CD27L o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante síntesis in cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C-terminales. Por ejemplo, el conjugado puede comprender una secuencia de polipéptido de señal o líder (por ejemplo, el líder de factor α de *Saccharomyces*) en el extremo N de un polipéptido de CD27L. El péptido de señal o líder dirige cotraduccionalmente o postraduccionalmente la transferencia del conjugado desde su zona de síntesis a un lugar dentro o fuera de la membrana celular o la pared celular. Las fusiones de polipéptidos CD27L pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación y la identificación de CD27L. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación antigénicos descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.011.912 y en Hopp y otros, *BioTechnology* 6:1204, 1988. Uno de tales péptidos es el péptido FLAG®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK), que es altamente antigénico y proporciona un epítopo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico que permite el ensayo rápido y la purificación fácil de proteína recombinante expresada. Esta secuencia también es segmentada específicamente por enteroquinasa mucosal bovina en el residuo in-

ES 2 281 896 T3

mediatamente siguiente al apareamiento Asp-Lys. Las proteínas de fusión protegidas con este péptido también pueden ser resistentes a la degradación intracelular en *E. coli*. Un hibridoma múrido denominado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se une al péptido DYKDDDDK en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes (según se describe en la Patente de EE.UU. 5.011.912) y se ha depositado en the American Type Culture Collection bajo el N° de registro HB 9259.

La presente invención incluye además polipéptidos de CD27L con o sin glicosilación de patrón natural asociada. CD27L expresado en sistemas de expresión de levadura o mamífero (por ejemplo, células COS-7) puede ser similar a o significativamente diferente de un polipéptido de CD27L natural en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la elección del sistema de expresión. La expresión de polipéptidos de CD27L en sistemas de expresión bacterianos, tales como *E. coli*, proporciona moléculas no glicosiladas.

Pueden prepararse constructos de DNA que codifican diversas adiciones o sustituciones de residuos o secuencias de aminoácidos, o deleciones de residuos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica o la unión. Por ejemplo, sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular de CD27L pueden modificarse para impedir la glicosilación mientras que se permite la expresión de un análogo de carbohidrato reducido homogéneo usando sistemas de expresión de levadura. Sitios de N-glicosilación en polipéptidos eucarióticos se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido excepto Pro e Y es Ser o Thr. Modificaciones apropiadas para la secuencia de nucleótidos que codifica este triplete darán como resultado sustituciones, adiciones o deleciones que evitan el empalme de residuos de carbohidrato en la cadena lateral de Asn. Procedimientos conocidos para desactivar sitios de N-glicosilación en proteínas incluyen los descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.071.972 y EP 276.846. En otro ejemplo, secuencias que codifican residuos de Cys que no son esenciales para la actividad biológica pueden alterarse para hacer que los residuos de Cys se sometan a deleción o se reemplacen por otros aminoácidos, previniendo la formación de puentes de disulfuro intramoleculares incorrectos durante la renaturalización. Otras variantes se preparan mediante la modificación de residuos de aminoácido dibásicos adyacentes para mejorar la expresión en sistemas de levadura en los que está presente actividad de proteasa KEX2. EP 212.914 describe el uso de mutagénesis específica para el sitio para inactivar sitios de procesamiento de proteasa KEX2 en una proteína.

Variantes de CD27L presentes en la naturaleza también son abarcadas por la presente invención. Ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de episodios de reparación de mRNA alternativos (ya que CD27L está codificado por un gen multiexónico) o de la segmentación proteolítica de la proteína de CD27L, en donde se retiene la propiedad de unión a CD27. La reparación alternativa de mRNA puede dar una proteína de CD27L truncada pero biológicamente activa, tal como la forma soluble presente en la naturaleza de la proteína, por ejemplo. Variaciones atribuibles a proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los extremos N o C durante la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la retirada proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína de CD27L.

Secuencias de ácido nucleico dentro del alcance de la invención incluyen secuencias de DNA y RNA aisladas que se hibridan a las secuencias de nucleótidos de CD27L descritas aquí bajo condiciones de restricción moderada o severa, y que codifican CD27L biológicamente activo. Condiciones de hibridación de restricción moderada se refieren a condiciones descritas en, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Vol. 1, pp. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989). Condiciones de restricción moderada, según se define por Sambrook y otros, incluyen el uso de una solución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación de aproximadamente 55°C, 5 X SSC, durante la noche. Condiciones de restricción severa incluyen temperaturas superiores de hibridación y lavado. El experto reconocerá que la temperatura y la concentración salina de la solución de lavado pueden ajustarse según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

La presente invención proporciona así secuencias de DNA aisladas que codifican CD27L biológicamente activo, seleccionadas de: (a) DNA derivado de la región codificante de un gen de CD27L mamífero natural (por ejemplo, cDNA derivado de la región codificante del cDNA de CD27L múrido o humano aislado según se describe en el Ejemplo 4); (b) DNA capaz de hibridación a un DNA de (a) bajo condiciones moderadamente restrictivas y que codifica CD27L biológicamente activo; y (c) DNA que está degenerado como resultado del código genético con respecto a un DNA definido en (a) o (b) y que codifica CD27L biológicamente activo. Variantes que poseen la capacidad requerida para unirse a CD27 pueden identificarse mediante cualquier ensayo adecuado. La actividad biológica de CD27L puede determinarse, por ejemplo, mediante competición con respecto a la unión al dominio de unión al ligando de CD27 (es decir, ensayos de unión competitiva).

Un tipo de un ensayo de unión competitiva para polipéptido de CD27L usa un CD27L humano o múrido soluble radiomarcado y células intactas que expresan CD27 de la superficie celular (por ejemplo, líneas celulares tales como MP-1 descrita en el Ejemplo 2). En lugar de células intactas, podría substituirse CD27 soluble (tal como una proteína de fusión CD27/Fc) unido a una fase sólida a través de una interacción con Proteína A o Proteína G por la región Fc de la proteína de fusión. Otro tipo de ensayo de unión competitiva utiliza CD27 soluble radiomarcado, tal como la proteína de fusión CD27/Fc, y células intactas que expresan CD27L. Alternativamente, CD27L soluble podría unirse a una fase sólida.

Los ensayos de unión competitiva pueden realizarse usando metodología estándar. Por ejemplo, CD27L múrido radiomarcado puede usarse para competir con un homólogo de CD27L putativo para ensayar con respecto a la actividad

de unión frente a CD27 unido a la superficie. Pueden obtenerse resultados cualitativos mediante ensayos competitivos de unión a placas autorradiográficas, o pueden utilizarse gráficas de Scatchard para generar resultados cuantitativos.

Los ensayos de unión competitivos con células intactas que expresan CD27 pueden realizarse mediante dos métodos. En un primer método, células que expresan CD27 de la superficie celular se hacen crecer bien en suspensión o bien mediante adherencia a placas de cultivo tisular. Las células adherentes pueden retirarse mediante tratamiento con EDTA 5 mM durante 10 minutos a 37°C. En un segundo método, pueden usarse células COS transfectadas que expresan CD27 unido a la membrana. Células COS u otras células de mamífero, tales como la línea celular CV-1/EBNA-1, pueden transfectarse con cDNA de CD27 humano en un vector apropiado para expresar CD27 de longitud completa con una región extracelular.

Alternativamente, CD27 soluble puede unirse a una fase sólida tal como una matriz de cromatografía en columna o un sustrato similar adecuado para el análisis con respecto a la presencia de un resto detectable tal como ¹²⁵I. La unión a una fase sólida puede efectuarse, por ejemplo, obteniendo una proteína de fusión CD27/Fc y uniéndola a una matriz que contiene proteína A o proteína G.

Las características de unión de CD27L (incluyendo las variantes) también pueden determinarse usando el CD27 soluble conjugado (por ejemplo, ¹²⁵I-CD27/Fc) en ensayos competitivos similares a los descritos anteriormente. Sin embargo, en este caso, se usan células intactas que expresan CD27L o CD27L soluble unido a un sustrato sólido para medir la extensión hasta la que una muestra que contiene una variante de CD27 putativa compite con respecto a la unión de un CD27 soluble conjugado a CD27L.

El CD27L de la presente invención puede usarse en un ensayo de unión para detectar células que expresan CD27. Por ejemplo, CD27L o un dominio extracelular o uno de sus fragmentos puede conjugarse a un resto detectable tal como ¹²⁵I. El radiomarcaje con ¹²⁵I puede realizarse mediante cualquiera de varias metodologías estándar que dan una molécula de ¹²⁵I-CD27L funcional marcada hasta una actividad específica alta. Alternativamente, puede usarse otro resto detectable tal como una enzima que puede catalizar una reacción colorimétrica o fluorimétrica, biotina o avidina. Las células que han de probarse con respecto a la expresión de CD27 pueden ponerse en contacto con CD27L conjugado. Después de la incubación, el CD27L conjugado no unido se retira y la unión se mide usando el resto detectable.

Los polipéptidos de CD27L pueden existir como oligómeros, tales como dímeros o trímeros. Los oligómeros están conectados mediante enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína en diferentes polipéptidos de CD27L. En una modalidad de la invención, se crea un dímero de CD27L fusionando CD27L a la región Fc de un anticuerpo (IgG1) de una manera que no interfiere con la unión de CD27L al dominio de unión al ligando de CD27. El polipéptido de Fc preferiblemente se fusiona al extremo N de un CD27L soluble (que comprende solo el dominio extracelular). Un procedimiento para aislar DNA que codifica una región Fc de IgG para el uso en la preparación de proteínas de fusión se presenta en el Ejemplo 1 posteriormente. Una fusión génica que codifica la proteína de fusión CD27L/Fc se inserta en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión CD27L/Fc se dejan ensamblar de forma muy similar a moléculas de anticuerpo, con lo que se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre polipéptidos de Fc, dando CD27L divalente. Si se elaboran proteínas de fusión con cadenas tanto pesadas como ligeras de un anticuerpo, es posible formar un oligómero de CD27L con tanto como cuatro regiones extracelulares de CD27. Alternativamente, pueden conectarse dos dominios de CD27L soluble con un conector peptídico tal como la secuencia conectora Gly₄SerGly₅Ser descrita en la Patente de Estados Unidos 5.073.627.

La presente invención proporciona oligómeros de dominios extracelulares de CD27L o sus fragmentos, conectados mediante interacciones disulfuro o expresados como polímeros de fusión con o sin grupos conectores de aminoácidos espaciadores. Por ejemplo, una molécula de CD27L dímera puede conectarse mediante un grupo de conexión de la región Fc de IgG.

La presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes para la expresión de CD27L y células huésped transformadas con los vectores de expresión. Puede emplearse cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen una secuencia de DNA de CD27L (una secuencia de DNA sintética o derivada de cDNA que codifica un polipéptido de CD27L) conectada operablemente a secuencias de nucleótidos reguladoras de la transcripción o la traducción adecuadas, tales como las derivadas de un gen de mamífero, microbio, virus o insecto. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, operadores o potenciadores transcripcionales, un sitio de unión ribosómico de mRNA y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y la terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están conectadas operablemente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de DNA de CD27L. Así, una secuencia de nucleótidos promotora está conectada operablemente a una secuencia de DNA de CD27L si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de DNA de CD27L. La capacidad para replicarse en las células huésped deseadas, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección mediante el cual se identifican transformantes, pueden incorporarse adicionalmente en el vector de expresión.

Además, secuencias que codifican péptidos de señal apropiados que no son naturales para el gen de CD27L pueden incorporarse en vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de DNA para un péptido de señal (líder secretor) puede fusionarse en el marco a la secuencia de CD27L de modo que el CD27L se traduzca inicialmente como una proteína de fusión que comprende péptido de señal. Un péptido de señal que es funcional en las células huésped pre-

tendidas potencia la secreción extracelular del polipéptido de CD27L. El péptido de señal se segmenta del polipéptido de CD27L durante la secreción de CD27L desde la célula.

5 Células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos de CD27L incluyen procariotas, células de levadura o células eucarióticas superiores. Vectores de clonación y expresión apropiados para el uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos se describen, por ejemplo, en Pouwels y otros, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, (1985). También podrían emplearse sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos de CD27L usando RNAs derivados de constructos de DNA descritos aquí.

10 Los procariotas incluyen organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilli*. Células huésped procarióticas adecuadas para la transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y otras especies diversas dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. En una célula huésped procariótica, tal como *E. coli*, un polipéptido de CD27L puede incluir un residuo de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula huésped procariótica. La Met N-terminal puede segmentarse del polipéptido de CD27L recombinante expresado.

15 Vectores de expresión para el uso en células huésped procarióticas comprenden generalmente uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles de células huésped procarióticas incluyen los derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y proporciona así medios simples para identificar células transformadas. Un promotor apropiado de una secuencia de DNA de CD27L se inserta en el vector pBR322. Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU. de A.).

20 Secuencias promotoras comúnmente usadas para vectores de expresión de células huésped procarióticas recombinantes incluyen β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang y otros, *Nature* 275:615, 1978; y Goeddel y otros, *Nature* 281:544, 1979), sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel y otros, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980 y EP-A-36776) y promotor *tac* (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión de células huésped procarióticas particularmente útil emplea un promotor P_L del fago λ y una secuencia represora termolábil de c1857ts. Vectores plasmídicos disponibles de the American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor P_L de λ incluyen el plásmido pHUB2 (residente en la cepa de *E. coli* JMB9 (ATCC 37092)) y pPLc28 (residente en *E. coli* PR1 (ATCC 53082)).

35 CD27L puede expresarse alternativamente en células huésped de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). También pueden emplearse otros géneros de levadura, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo una secuencia de origen de replicación procedente de un plásmido de levadura 2μ , una secuencia que se replica autónomamente (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador seleccionado. Secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y otros, *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess y otros, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968 y Holland y otros, *Biochem.* 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión en levadura se describen adicionalmente en Hitzeman, EPA-73.657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible con glucosa descrito por Russell y otros (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) y Beier y otros (*Nature* 300:724, 1982). Vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* pueden construirse insertando secuencias de DNA procedentes de pBR322 para la selección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) en los vectores de levadura descritos anteriormente.

40 La secuencia líder de factor α de levadura puede emplearse para dirigir la secreción del polipéptido de CD27L. La secuencia líder de factor α a menudo se inserta entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. Véanse, por ejemplo, Kurjan y otros, *Cell* 30:933, 1982 y Bitter y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330; 1984. Otras secuencias líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes procedentes de huéspedes de levadura son conocidas por los expertos en la técnica. Una secuencia líder puede modificarse cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder al gen estructural.

45 Protocolos de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica. Uno de tales protocolos es descrito por Hinnen y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978. El protocolo de Hinnen y otros selecciona transformantes Trp⁺ en un medio selectivo, en donde el medio selectivo consiste en base nitrogenada de levadura al 0,67%, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 2%, 10 μ g/ml de adenina y 20 μ g/ml de uracilo.

50 Células huésped de levadura transformadas por vectores que contienen secuencia promotora ADH2 pueden hacerse crecer para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consiste en extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 1% complementado con 80 μ g/ml de adenina y 80 μ g/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 se produce cuando la glucosa se agota del medio.

ES 2 281 896 T3

También podrían emplearse sistemas de cultivo de células huésped de mamífero o insecto para expresar polipéptidos de CD27L recombinantes. Sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto son revisados por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). También pueden emplearse líneas celulares establecidas de origen mamífero. Ejemplos de líneas de células huésped mamíferas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman y otros, *Cell* 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa y líneas celulares BHK (ATCC CRL 10) y la línea celular CV-1/EBNA-1 derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CV1 (ATCC CCL 70) que es descrita por McMahan y otros (*EMBO J.* 10: 2821, 1991).

Secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión de células huésped de mamífero pueden cortarse de genomas virales. Secuencias promotoras y secuencias potenciadoras comúnmente usadas se derivan de poliomavirus, adenovirus 2, virus de simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Pueden usarse secuencias de DNA derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, sitios de origen, promotor temprano y tardío, potenciador, de reparación y de poliadenilación de SV40, para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia génica estructural en una célula huésped mamífera. Los promotores tempranos y tardíos virales son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen de replicación viral (Fiers y otros, *Nature* 273:113, 1978). También pueden usarse fragmentos de SV40 menores o mayores, con tal de que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hasta el sitio *Bgl* I situado en el sitio de origen de replicación viral de SV40.

Vectores de expresión ejemplares para el uso en células huésped mamíferas pueden construirse según se describe por Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983). Un sistema útil para la expresión estable de alto nivel de cDNAs mamíferos en células epiteliales mamarias múridas C127 puede construirse substancialmente como se describe por Cosman y otros (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986). Un vector de alta expresión útil, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman y otros, *Nature* 312:768, 1984, se ha depositado como ATCC 39890. Vectores de expresión mamíferos útiles adicionales se describen en EP-A-0367566 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 07/701.415, presentada el 16 de mayo de 1991, incorporada mediante referencia en la presente. Los vectores pueden derivarse de retrovirus. Para la expresión de una proteína tipo II que carece de una secuencia de señal natural, puede añadirse una secuencia de señal heteróloga, tal como la secuencia de señal para interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente de Estados Unidos 4.965.195 o la secuencia de señal para el receptor de interleuquina-2 descrita en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 06/626.667, presentada el 2 de julio de 1984.

La presente invención proporciona proteína de CD27L substancialmente homogénea, que puede producirse mediante sistemas de expresión recombinantes como los descritos anteriormente o purificarse de células presentes en la naturaleza. El CD27L se purifica hasta homogeneidad substancial, según se indica por una sola banda de proteína durante el análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

En una modalidad de la presente invención, CD27L se purifica de una fuente celular usando cualquier técnica de purificación de proteínas adecuada. Las células pueden, por ejemplo, ser linfocitos T activados de una especie mamífera de interés, tal como la línea celular múrida 7B9 descrita en los ejemplos 2 y 3 o células T de sangre periférica humana inducidas.

Un procedimiento alternativo para producir la proteína de CD27L comprende cultivar una célula huésped transformada por un vector de expresión que comprende una secuencia de DNA que codifica CD27L bajo condiciones tales que se expresa CD27L. La proteína de CD27L se recupera a continuación del medio de cultivo o los extractos celulares, dependiendo del sistema de expresión empleado. Como reconocerá un experto, los procedimientos para purificar el CD27L recombinante variarán de acuerdo con factores tales como el tipo de células huésped empleado y si el CD-30-L se secreta o no al medio de cultivo.

Por ejemplo, cuando se emplean sistemas de expresión que secretan la proteína recombinante, el medio de cultivo puede concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación tal como un medio de filtración. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos (por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes) para purificar adicionalmente CD27L. Algunas o la totalidad de las etapas de purificación precedentes, en diversas combinaciones, pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante substancialmente homogénea.

También es posible utilizar una columna de afinidad que comprende el dominio de unión a ligando de CD27 para purificar por afinidad polipéptidos de CD27L expresados. Los polipéptidos de CD27L pueden retirarse de una columna de afinidad en un tampón de elución de alto contenido de sal y a continuación dializarse en un tampón de contenido de sal inferior para el uso. Alternativamente, la columna de afinidad puede comprender un anticuerpo que se une a

ES 2 281 896 T3

CD27L. El Ejemplo 5 describe un procedimiento para emplear la proteína de CD27L de la presente invención para generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD27L.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se aísla habitualmente mediante rotura inicial de las células huésped, centrifugación, extracción de las pellas celulares si hay polipéptido insoluble o del fluido sobrenadante si hay polipéptido soluble, seguido por una o más etapas de concentración, precipitación por sales, intercambio iónico, purificación por afinidad o cromatografía de exclusión por tamaños. Finalmente, puede emplearse RP-HPLC para etapas de purificación finales. Las células microbianas pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes de lisis celular.

Las células huésped de levadura transformadas se emplean preferiblemente para expresar CD27L como un polipéptido secretado. Esto simplifica la purificación. Polipéptido recombinante secretado procedente de una fermentación de células huésped de levadura puede purificarse mediante métodos análogos a los descritos por Urdal y otros (*J. Chromatog.* 296:171, 1984). Urdal y otros describen dos etapas de HPLC en fase inversa secuenciales para la purificación de IL-2 humana recombinante en una columna de HPLC preparativa.

La presente invención proporciona además oligonucleótidos antisentido o de sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de una sola hebra (bien RNA o bien DNA) capaz de unirse a secuencias diana de mRNA (sentido) de CD27L o DNA (antisentido) de CD27L. Los oligonucleótidos de antisentido o sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de cDNA de CD27L. Tal fragmento comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos. La capacidad para crear un oligonucleótido de antisentido o sentido, basándose en una secuencia de cDNA para una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988 y van der Krol y otros *BioTechniques* 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos de antisentido o sentido a secuencias de ácido nucleico diana da como resultado la formación de dúplex que bloquean la transcripción (RNA) o la traducción (DNA) mediante uno de varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante otros medios. Los oligonucleótidos antisentido pueden usarse así para bloquear la expresión de proteínas de CD27L. Los oligonucleótidos de antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen cadenas principales de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces de azúcar, tales como las descritas en WO91/06629) y en donde tales enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables in vivo (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen especificidad de secuencia para poder unirse a secuencias de nucleótidos diana. Otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido o antisentido incluyen los oligonucleótidos que están conectados covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10448, y otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia de ácido nucleico diana, tales como poli(L-lisina). Más aún, agentes intercaladores, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden empalmarse a oligonucleótidos de sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido de antisentido o sentido para la secuencia de nucleótidos diana. Los oligonucleótidos de antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, transfección de DNA mediada por CaPO₄, electroporación u otros vectores de transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr. Los oligonucleótidos de antisentido o sentido se introducen preferiblemente en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante inserción del oligonucleótido de antisentido o sentido en un vector retroviral adecuado, a continuación poniendo en contacto la célula con el vector de retrovirus que contiene la secuencia insertada, bien in vivo o bien ex vivo. Vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, el retrovirus múrido M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase la Solicitud PCT US 90/02656). Alternativamente, pueden usarse otras secuencias promotoras para expresar el oligonucleótido.

Los oligonucleótidos de sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula que se une a ligando, según se describe en WO 91/04753. Moléculas que se unen a ligandos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula que se une a ligando no interfiere substancialmente con la capacidad de la molécula que se une a ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido de sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, un oligonucleótido de sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, según se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido de sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente dentro de la célula mediante una lipasa endógena.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar modalidades particulares y no para limitar el alcance de la invención.

ES 2 281 896 T3

Ejemplo 1

Preparación de Proteína de Fusión de CD27 Soluble/Fc

5 Este ejemplo describe la construcción de un vector que codifica CD27/Fc que expresa una proteína de fusión CD27 soluble/Fc para el uso en la detección de clones de cDNA que codifican un ligando de CD27 (CD27L). Un fragmento de cDNA que codifica la región extracelular (dominios de unión a ligandos) del receptor humano CD27 se obtuvo usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se basa en la secuencia publicada por Camerini y otros, *J. Immunol.* 147:3165, 1991.

10 El cDNA de CD27 usado como una plantilla en la reacción de PCR se obtuvo de D. Camerini y se usó como una plantilla en la reacción de PCR. El cebador 5' empleado en la reacción de PCR era un oligonucleótido de una sola hebra (27-mero) que tenía la siguiente secuencia:

15 N° ID SEC:3: 5'-ATAGCGGCCGCCTGGGCAGGGACCATG-3'

Este cebador comprende un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *NotI* (subrayado) aguas arriba de una secuencia que contiene los nucleótidos 83-103 de la secuencia de CD27 publicada por Camerini y otros, hasta la metionina N-terminal (codificada por el codón de iniciación de la traducción ATG).

20 El cebador 3' empleado en la reacción de PCR era un oligonucleótido de una sola hebra (39-mero) de la secuencia:

N° ID SEC:4: 3'-GTGACCGGTGGGGTTTCTAGGGACCTCGGGTCTAGAGCG-5'

25 Este cebador comprende una secuencia (negrita) que es complementaria a los nucleótidos 629-652 (que codifican los aminoácidos 157-164) de la secuencia de CD27 publicada por Camerini y otros. Este cebador se diseñó para eliminar los últimos 7 aminoácidos del dominio extracelular de CD27. La secuencia CTCGGG que sigue a la secuencia de CD27 es complementaria a los codones para Glu y Pro. Glu y Pro son los dos primeros aminoácidos de un fragmento Fc de anticuerpo que se fusiona al extremo C del fragmento de CD27 que se describe posteriormente. El cebador también sitúa un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *BgIII* (subrayado) aguas abajo, para el uso en el empalme de una secuencia de DNA que codifica el resto del gen que codifica Fc.

30 La reacción de PCR puede efectuarse usando cualquier procedimiento adecuado, tal como los descritos en Sarki y otros, *Science* 239:487 (1988); en *Recombinant DNA Methodology*, Wu y otros, eds., Academic Press Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; y en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis y otros, eds., Academic Press, Inc. (1990). Un ejemplo de un procedimiento de PCR adecuado es como sigue. Todas las temperaturas son en grados centígrados. Los siguientes reactivos de PCR se añaden a un tubo de microcentrífuga de Eppendorf de 0,5 ml: 10 μ l de 10 x tampón de PCR (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3 a 25°C, MgCl₂ 25 mM y 1 mg/ml de gelatina) (Perkins-Elmer Cetus, Norwalk, CN), 8 μ l de una solución 2,5 mM que contiene cada dNTP (dATP 2 mM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM y dTTP 2 mM), 2,5 unidades (0,5 μ l de 5000 unidades estándar/ml de solución) de DNA polimerasa de *Taq* (Perkins-Elmer Cetus), 1 ng de DNA de plantilla, 100 picomoles de cada uno de los cebadores oligonucleotídicos y agua hasta un volumen final de 100 μ l. La mezcla final se cubre a continuación con 100 μ l de aceite de parafina. La PCR se lleva a cabo usando un ciclador térmico de DNA (Ericomp, San Diego, CA).

45 En un procedimiento preferido, la plantilla se desnaturizó a 94°C durante 5 minutos, seguido por 5 ciclos de 94°C durante 1 minuto (desnaturización), 50°C durante 1 minuto (reasociación) y 72°C durante 1 minuto (extensión); seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, siendo seguido el último ciclo por una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Una parte alícuota de los productos de esta reacción de PCR se reamplificó en una segunda reacción de PCR, usando las mismas condiciones.

50 El fragmento de DNA deseado amplificado mediante esta reacción de PCR comprendía un sitio *NotI* aguas arriba de una secuencia que codifica el dominio extracelular de CD27 (pero sometiendo a delección los últimos siete aminoácidos para retirar el aminoácido Cys), seguido por un sitio *BgIII*. Los productos de reacción de PCR se digirieron con *NotI* y *BgIII* y el fragmento deseado se purificó mediante electroforesis en gel. La retirada del aminoácido Cys era necesaria para facilitar la expresión de la proteína de fusión CD27/Fc descrita posteriormente.

55 Una secuencia de DNA que codifica un fragmento de Fc de anticuerpo, que ha de condensarse al fragmento de DNA que codifica CD27, se preparó como sigue. DNA que codifica un polipéptido monocatenario derivado de la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano se ha clonado en el sitio *SpeI* del vector pBLUESCRIPT SK[®], que está disponible comercialmente de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California. Este vector plasmídico es replicable en *E. coli* y contiene un segmento policonector que incluye 21 sitios de restricción únicos. Un sitio *BgIII* único se introdujo cerca del extremo 5' de la secuencia que codifica Fc insertada.

65 El polipéptido de Fc codificado por el DNA se extiende desde la región de bisagra N-terminal hasta el extremo C natural, es decir, es una región de Fc de anticuerpo esencialmente de longitud completa. También pueden emplearse fragmentos de las regiones Fc, por ejemplo, aquellos que están truncados en el extremo C-terminal. Los fragmentos contienen preferiblemente múltiples residuos de cisteína (al menos los residuos de cisteína en la reacción de la bisagra)

ES 2 281 896 T3

para permitir que se formen enlaces disulfuro intercatenarios entre las porciones polipeptídicas de Fc de dos proteínas de fusión CD27/Fc separadas, formando dímeros según se analiza anteriormente.

5 El vector recombinante que contiene la secuencia de Fc se digiere con *Bgl*III (que segmenta solo en el extremo 5') y *Not*I (que segmenta el vector en el sitio de clonación múltiple aguas abajo de inserto de cDNA de Fc). El fragmento que codifica Fc (aproximadamente 720 pb de longitud) se aisló mediante procedimientos convencionales usando electroforesis en gel de agarosa LMT.

10 El fragmento *Not*I/*Bgl*III de DNA que codifica CD27 y el fragmento de DNA *Bgl*III/*Not*I que codifica Fc preparados anteriormente se ligaron en un vector de expresión denominado pDC406 como sigue. El plásmido pDC406, que ha sido descrito por McMahan y otros (*EMBO J.* 10:2821, 1991), es un vector de expresión para el uso en células de mamífero, pero también es replicable en células de *E. coli*.

15 pDC406 contiene orígenes de replicación derivados de SV40, virus de Epstein-Barr y pBR322 es un derivado de HAV-EO descrito por Dower y otros, *J. Immunol.* 142:4314, 1989). pDC406 difiere de HAV-EO por la delección del intrón presente en la secuencia líder tripartita de adenovirus 2 en HAV-EO. pDC406 se digirió con *Not*I, que segmenta el plásmido en un sitio de clonación múltiple justo 3' del sitio *Sal*I y a continuación se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP) para prevenir la autoligación.

20 La ligación tridireccional para enlazar los fragmentos de DNA del vector, Fc y CD27 se efectuó bajo condiciones convencionales y las células de *E. coli* se transformaron con la mezcla de ligación. Se encontró que un plásmido del tamaño deseado que se recuperaba de las células de *E. coli* comprendía el inserto de fusión génico CD27/Fc, pero en la orientación errónea para la expresión. La fusión génica CD27/Fc se cortó de este plásmido recombinante mediante digestión con *Not*I y se ligó a pDC406 digerido con *Not*I y tratado con CIAP. Las células de *E. coli* se transformaron con la mezcla de ligación. Un plásmido recombinante que contenía el inserto en la orientación deseada se aisló. La secuencia de CD27 se fusionó (en el mismo marco de lectura) a la secuencia de Fc aguas abajo.

30 Las moléculas de fusión CD27/Fc preferiblemente se sintetizan en cultivo celular de mamífero recombinante debido a que generalmente son demasiado grandes y complejas para sintetizarse mediante métodos de expresión procarionótica. Ejemplos de células de mamífero adecuadas para expresar una proteína de fusión receptor/Fc incluyen células CV-1 (ATCC CCL 70) y células COS-8 (ATCC CRL 1651), ambas derivadas de riñón de mono.

35 El constructo de DNA pDC406/CD27/Fc se transfectó en la línea celular de riñón de mono CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478). En células huésped de mamífero tales como CV-1/EBNA-1, la proteína de fusión CD27/Fc se expresa fuera del promotor de la región de transactivación (TAR) de HIV. La línea celular CV-1/EBNA-1 se derivó mediante transfección de la línea celular CV-1 (ATCC CCL 70) con un gen que codifica antígeno nuclear de virus de Epstein-Barr 1 (EBNA-1) que expresa constitutivamente EBNA-1 conducido desde el potenciador/promotor intermedio-temprano de CMV humano según se describe por McMahan y otros, anteriormente. El gen de EBNA-1 permite la replicación episomática de vectores de expresión, tales como pDC406, que contienen el origen de replicación de EBV.

45 Células CV-1/EBNA transfectadas con el vector pDC406/CD27/Fc se cultivaron en botellas giratorias para permitir la expresión transitoria de la proteína de fusión, que se secreta en el medio de cultivo a través del péptido de señal de CD27. La proteína de fusión CD27/Fc se purificó mediante cromatografía de afinidad. Brevemente, un litro de sobrenadante de cultivo que contiene la proteína de fusión CD27/Fc se purificó filtrando los sobrenadantes (por ejemplo, en un filtro de 0,45 μ) y aplicando el filtrado a una columna de afinidad de proteína G (Schleicher y Schuell, Keene, NH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La porción de Fc de la proteína de fusión se une mediante la Proteína G a la columna. La proteína de fusión unida se eluyó de la columna y la pureza se confirmó en un gel de SDS teñido con plata.

50 Ejemplo 2

Rastreo de Líneas Celulares para la Unión de CD27

55 Este ejemplo describe el rastreo de ciertas líneas celulares con respecto a la capacidad para unirse a una proteína de fusión CD27/Fc. El ensayo de rastreo usado era un método en dos etapas que implicaba proteína de fusión CD27/Fc unida a células, seguido por ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón unido a la porción Fc de la proteína de fusión CD27/Fc. Se consideraba que las líneas celulares que se encontraba que eran capaces de unirse a CD27/Fc eran candidatos para el uso como fuentes de ácido nucleico en el intento de clonar CD27L.

60 El anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón se obtuvo de Jackson Laboratories. Este anticuerpo mostraba unión mínima a proteínas de Fc unidas al receptor Fc γ . El anticuerpo se marcó usando el método de cloramina T. Brevemente, se preparó una columna P6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un tubo de microcentrífuga, 10 μ g de anticuerpo se disolvieron en 10 μ l de PBS. Se añadieron 2000 μ Ci de Na ¹²⁵I libre de portador y la solución se mezcló bien. Se añadieron a continuación 15 μ l de una solución recientemente preparada de cloramina T (32 μ g/ml en tampón de fosfato sódico 0,05 M (pH 7,2)) y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se aplicó inmediatamente a la columna P6. El anticuerpo radiomarcado se eluyó a continuación de la columna recogiendo fracciones de 100-150 μ l de eluato. Se añadieron medios de unión a las fracciones de los picos para llevar

ES 2 281 896 T3

el volumen total de cada fracción hasta 2 ml. La radioyodación daba actividades específicas en el intervalo de 5-10 x 10¹⁵ cpm/mmol de proteína.

La línea celular MP-1 se generó para el uso en el rastreo con respecto a la unión de CD27/Fc. MP-1 es una línea celular linfoblastoide B transformada con virus de Epstein-Barr (EBV) espontánea desarrollada de células mononucleares de sangre periférica derivadas de un donante normal. Después de dos semanas, las células B proliferativas se sometieron a dos rondas de clonación a 0,3 células por pocillo en medio RPMI complementado con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células MP-1 se derivan de uno de tales clones.

La línea celular MP-1 se rastreó con respecto a la unión de CD27/Fc mediante el siguiente procedimiento. Aproximadamente 2 x 10⁶ células se cultivaron en placas de 96 pocillos. Se añadieron a las células 5 ml de medio de unión (RPMI 1640 que contiene 25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 2 mg/ml de azida sódica, Hepes 20 mM, pH 7,2) y las células se incubaron a continuación en presencia o ausencia de CD27/Fc durante 1 hora a 37°C con agitación suave. Las células se sedimentaron de la mezcla mediante la centrifugación de las placas de 96 pocillos, se lavaron con PBS, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en medio de unión. Las células se inocularon a continuación con el ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón, preparado como se describe anteriormente, durante 1 hora a 37°C. Las células también se incubaron con ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón en presencia de anticuerpo anti-(Fc humana) sin marcar como un control negativo. Después de 1 hora de incubación con el ¹²⁵I-anticuerpo, las células y el ¹²⁵I-anticuerpo no unido se separaron mediante el método de separación con aceite de ftalato, esencialmente como se describe por Dower y otros, *J. Immunol.* 132:751, 1984. El ¹²⁵I-anticuerpo unido a células y libre se cuantificó en un contador Packard Autogamma. Las células MP-1 poseían números significativos de CD27L unido a la superficie celular, sugiriendo que las células MP-1 pueden ser una fuente adecuada de mRNA para clonar cDNA de CD27L.

Ejemplo 3

Construcción de una Biblioteca de cDNA

Este ejemplo describe la preparación de una biblioteca de cDNA a partir de células B MP-1 humanas para la clonación por expresión de CD27L humano. La técnica de construcción de la biblioteca era substancialmente similar a la descrita por Ausubel y otros, eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, Vol. 1, (1987). En general, RNA total se extrajo de cultivos de células MP-1 sometidas a lisis con HCl de guanidina 8M usando precipitación diferencial con etanol y el mRNA de poli(A)⁺ se aisló y se enriqueció mediante cromatografía con oligo-dT-celulosa.

Se elaboró cDNA de doble hebra a partir de una plantilla de RNA substancialmente como se describe por Gubler y otros, *Gene* 25:263, 1983. Los fragmentos de mRNA de poli(A)⁺ se convirtieron en híbridos de RNA-cDNA usando transcriptasa inversa cebada con hexanucleótidos aleatorios. Los híbridos de RNA-cDNA se convirtieron a continuación en fragmentos de cDNA de doble hebra usando RNAasa H en combinación con DNA polimerasa I. El cDNA de doble hebra resultante se cortó en extremos romos con DNA polimerasa de T4.

Los siguientes adaptadores *Bgl*III sin quinasa (es decir, desfosforilados)

Nº ID SEC:5: 5'-GATCTTGGAACGAGACGACCTGCT-3' (24-mero)

Nº ID SEC:6: 3'-AACCTTGCTCTGCTGGACGA-5' (20-mero)

se ligaron a extremos 5' de los dúplex de cDNA de extremos romos anteriores, usando el método de clonación con adaptador descrito en Haymerle y otros, *Nucleic Acids Res.* 14:8615, 1986. Bajo las condiciones descritas, solo el oligonucleótido 24-mero (hebra superior) se unirá covalentemente al cDNA durante la reacción de ligación. Los adaptadores no unidos covalentemente (incluyendo el oligonucleótido 20-mero complementario descrito anteriormente y cualesquiera adaptadores no ligados) se retiraron mediante cromatografía de filtración en gel a 65°C, dejando salientes no autocomplementarios de 24 nucleótidos en los extremos de cDNA.

El cDNA tratado con adaptador se insertó en pDC303, un vector de expresión mamífero que también se replica en *E. coli*. pDC303 se ensambló a partir de DNA de pDC201 (un derivado de pMLSV, previamente descrito por Cosman y otros, *Nature* 312: 768, 1984), SV40 y citomegalovirus y comprende, en secuencia con la dirección de transcripción desde el origen de replicación, los siguientes componentes: (1) secuencias de SV40 de las coordenadas 5171-270 que contienen el origen de replicación, secuencias potenciadoras y promotores temprano y tardío; (2) regiones promotora y potenciadora de citomegalovirus (nucleótidos 671-63 de la secuencia publicada por Bochart y otros (*Cell* 41:521, 1985); (3) adenovirus-2 de las coordenadas 5779-6079 que contiene el primer exón de líder tripartito (TPL), el segmento 7101-7172 y 9634-9693 que contiene el segundo exón y parte del tercer exón del TPL y un sitio de clonación múltiple (MCS) que contiene sitios para XhoI, KpnI, SmaI y *Bgl*II; (4) segmentos de SV40 de las coordenadas 4127-4100 y 2770-2533 que contienen las señales de poliadenilación y terminación para la transcripción temprana; (5) secuencias de adenovirus-2 de las coordenadas 10532-11156 de los genes de RNA asociados a virus VAI y VAII de pDC201; y (6) secuencias de pBR322 de las coordenadas 4363-2486 y 1094-375 que contienen el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación.

ES 2 281 896 T3

La biblioteca de cDNA de MP-1 en pDC303 se introdujo en la cepa de *E. coli* DH10B mediante electroporación. Los recombinantes se cultivaron en placa para proporcionar aproximadamente 5.000 colonias por placa. Estos recombinantes se reunieron para dar una gran reserva de aproximadamente 500.000 recombinantes para el rastreo.

Partes alícuotas de esta gran reserva se cultivaron en placa para dar fracciones reunidas de 1000 colonias. DNA plasmídico se aisló de estas fracciones reunidas y se transfirió en una capa subconfluente de células CV-1/EBNA-1 usando DEAE-dextrano seguido por tratamiento con cloroquina, de forma similar a lo descrito por Luthman y otros, *Nucl. Acids Res.* 11:1295 (1983) y McCutchan y otros, *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351 (1986). Las células CV-1/EBNA-1 se derivaron como sigue. La línea celular CV-1/EBNA-1 expresa constitutivamente antígeno-1 nuclear de EBV conducido desde el potenciador/promotor intermedio-temprano de CMV. La línea celular de riñón de mono verde africano, CCV-1 (ATCC CCL 70), se cotransfectó con 5 µg de pSV2gpt (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072, 1981) y 25 µg de pDC303/EBNA-1 usando una técnica de coprecipitación con fosfato cálcico (Ausubel y otros, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, Nueva York, 1987). pDC303/EBNA-1 se construyó a partir de pDC302 (Mosley y otros, *Cell* 59:335, 1989) en dos etapas. En primer lugar, el intrón presente en la secuencia líder tripartita de adenovirus se sometió a delección reemplazando un fragmento PvuII a ScaI que abarca el intrón por el siguiente par de oligonucleótidos sintéticos para crear el plásmido pDC303:

Nº ID SEC:7 5'CTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGT-3'

Nº ID SEC:8 3'GACAACCCGAGCGCCAACCTCTGTTTGAGAAGCGCCAGAAAGGTCA-5'

En segundo lugar, un fragmento de restricción HindIII-AhaII que codifica antígeno nuclear de virus de Epstein-Barr 1 (EBNA-1) y que consiste esencialmente en las coordenadas de EBV 107.932 a 109.894 (Baer y otros, *Nature* 310:207, 1984) se insertó a continuación en el sitio de clonación múltiple de pDC303 para crear el plásmido pDC303/EBNA-1. Las células transfectadas se hicieron crecer en presencia de hipoxantina, aminopterina, timidina, xantina y ácido micofenólico de acuerdo con métodos estándar (Ausubel y otros, anteriormente; Mulligan y Berg, anteriormente) para seleccionar las células que habían incorporado establemente los plásmidos transfectados. Las colonias resistentes a fármacos resultantes se aislaron y se expandieron individualmente en líneas celulares para el análisis. Las líneas celulares se rastrearon con respecto a la expresión de EBNA-1 funcional. Se encontró usando este ensayo que una línea celular, el clon 68, expresaba EBNA-1, y se denominó CV-1/EBNA-1.

Para transfectar las células CV-1/EBNA-1 con la biblioteca de cDNA, las células se mantuvieron en medio completo (medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10% (v/v), 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM) y se cultivaron en placa a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en portaobjetos de cámara de un solo pocillo (Lab-Tek). Los portaobjetos se pretrataron con 1 ml de fibronectina humana (10 µg/ml en PBS) durante 30 minutos seguido por un lavado con PBS. El medio se retiró de la capa de células adherentes y se reemplazó por 1,5 ml de medio completo que contiene sulfato de cloroquina 66,6 µM. Se añadieron a continuación a las células 0,2 ml de solución de DNA (2 µg de DNA, 0,5 mg/ml de DEAE-dextrano en medio completo que contiene cloroquina) y se incubaron durante 5 horas. Después de la incubación, el medio se retiró y las células se sometieron a choque mediante la adición de medio completo que contenía DMSO al 10% durante de 2,5 a 20 minutos, seguido por la sustitución de la solución por medio completo reciente. Las células se hicieron crecer en cultivo para permitir la expresión transitoria de las secuencias insertadas. Estas condiciones conducían a una frecuencia de transfección de 80% en células CV-1/EBNA-1 supervivientes.

Ejemplo 4

Aislamiento de cDNA de CD27L Humano

Las células transfectadas se cultivaron durante de dos a tres días en portaobjetos de vidrio con cámara (Lab-Tek) para permitir la expresión transitoria de las secuencias de DNA insertadas. Monocapas transfectadas de células CV-1/EBNA-1 se ensayaron con respecto a la expresión de CD27L uniéndose a ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) mediante autorradiografía del portaobjetos según se describe posteriormente.

Las células CV-1/EBNA-1 transfectadas (adheridas a los portaobjetos con cámara) se lavaron una vez con medio de unión con leche desnatada en polvo (BM-NFDM) (medio RPMI 1640 que contiene 25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 2 mg/ml de azida sódica, HEPES 20 mM, pH 7,2, y 50 mg/ml de leche desnatada en polvo). Las células se incubaron a continuación con CD27/Fc en BM-NFDM (1 µg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, las monocapas celulares en los portaobjetos con cámara se lavaron tres veces con BM-NFDM para retirar proteína de fusión CD27/Fc no unida y a continuación se incubaron con 40 ng/ml de ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón (una dilución 1:50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con BM-NFDM, seguido por 2 lavados con solución tamponada con fosfato (PBS) para retirar ¹²⁵I-anticuerpo anti-(Fc humana) de ratón no unido. Las células se fijaron incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2,5% en PBS, pH 7,3, se lavaron dos veces en PBS y se secaron al aire. Los portaobjetos con cámara que contenían las células se expusieron en un Phosphorimager durante la noche, a continuación se sumergieron en emulsión fotográfica Kodak GTNB-2 (6 x dilución en agua) y se expusieron en la oscuridad durante 3-5 días a 4°C en una caja a prueba de luz. Los portaobjetos se revelaron a continuación durante aproximadamente 4 minutos en revelador Kodak D19 (40 g/500 ml de agua), se enjuagaron en agua y se fijaron en fijador Agfa G433C. Los portaobjetos se examinaron indi-

ES 2 281 896 T3

vidualmente con un microscopio con 25-40 aumentos y las células positivas que expresaban CD27L se identificaron mediante la presencia de granos de plata autorradiográficos frente a un fondo claro.

5 Usando el sistema de autorradiografía del portaobjetos, aproximadamente 50.000 cDNAs se rastrearon en fracciones reunidas de aproximadamente 1.000 cDNAs hasta que el ensayo de una fracción reunida de transfectantes mostraba múltiples células claramente positivas con respecto a la unión a CD27/Fc. Esta fracción reunida se sometió a reparto a continuación en fracciones de 300 y de nuevo se rastreó mediante autorradiografía del portaobjetos y se identificó una fracción reunida positiva. Colonias individuales de esta fracción reunida de 300 se rastrearon hasta que se identificaba un solo clon (clon N° 60) que dirigía la síntesis de una proteína superficial con actividad de unión a CD27/Fc detectable. Este clon se aisló y su inserto se sometió a secuenciación para determinar la secuencia del clon 10 60 de cDNA de CD27L humano.

El vector de expresión de mamífero pDC304 que contenía CD27L humano (denominado pDC304/HuCD27L) se depositó en the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) el 18 de agosto de 1992 y se le asignó el número de registro ATCC 69052. El depósito se realizó bajo los términos del Tratado de Budapest. El Listado de Secuencias adjunto indica las secuencias de nucleótidos (N° ID SEC: 1) y de aminoácidos predicha del clon 60 (N° ID SEC: 1 y N° ID SEC: 2) y aparece información asociada al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones. 15

El análisis de la secuencia del clon resultante revelaba un inserto de 813 pb con un solo marco de lectura abierto largo capaz de codificar una proteína de 193 aminoácidos (N° ID SEC: 1). Los 20 aminoácidos aminoterminales estaban seguidos por 18 aminoácidos hidrófobos que presumiblemente funcionan como un anclaje de transmembrana. Esta falta de una secuencia de señal, la presencia de un dominio hidrófobo interno y la presencia de dos sitios de glicosilación conectados con N potenciales en el dominio C-terminal (en los aminoácidos Asn⁶³ y Asn¹⁷⁰) sugerían que CD27L es una proteína de transmembrana tipo II, que tiene un dominio carboxiterminal extracelular. 20

El clon de cDNA aislado contenía solo 37 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación supuesto (N° ID SEC: 1) sin codones de terminación en el marco. Además, la secuencia alrededor de este sitio de iniciación no está de acuerdo con el consenso para tales sitios descrito según se predice por Kozak, *Nucl. Acids. Res.* 12:857 (1984). Así, se llevó a cabo una reacción de "PCR anclada" de acuerdo con Carrier y otros, *Gene* 116:173 (1992) para clonar el extremo 5' del transcrito de CD27L para asegurar que no había un sitio de iniciación aguas arriba. Esto daba como resultado la identificación de 113 nucleótidos adicionales que precedían al extremo del clon aislado (N° ID SEC: 1). No se encontraron sitios de iniciación aguas arriba del que se identificaba previamente. 30

35 Ejemplo 5

Anticuerpos Monoclonales para CD27L

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales para CD27L. CD27L se expresa en células huésped de mamífero tales como células COS-7 o CV-1/EBNA-1 y se purifica usando cromatografía de afinidad a CD27/Fc. Puede usarse CD27L purificado para generar anticuerpos monoclonales contra CD27L usando técnicas convencionales, por ejemplo, las técnicas descritas en la Patente de EE.UU. 4.411.993. Brevemente, se inmunizan ratones con CD27L como un inmunógeno emulsificado en adyuvante completo de Freund y se inyectan en cantidades que varían de 10-100 µg subcutáneamente o intraperitonealmente. De diez a doce días más tarde, los animales inmunizados son reforzados con CD27L adicional emulsificado en adyuvante incompleto de Freund. Los ratones son reforzados periódicamente posteriormente con un esquema de inmunización de semanal a bisemanal. Se toman periódicamente muestras de suero mediante sangrado retroorbital o escisión de la punta de la cola para probar mediante ensayo de transferencia por gotas o ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción con Enzimas Ligadas), con respecto a anticuerpos para CD27L. 40

Después de la detección de una concentración de anticuerpo apropiada, a los animales positivos se les proporciona una última inyección intravenosa de CD27L en solución salina. De tres a cuatro días más tarde, los animales son sacrificados, las células del bazo se recogen y las células del bazo se fusionan a una línea celular de mieloma múrido (por ejemplo, NS 1 o Ag 8.653). Las fusiones generan células de hibridoma, que se cultivan en placa en placas de microvaloración múltiples en un medio selectivo para HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo. 45

Las células de hibridoma se rastrean mediante ELISA con respecto a la reactividad frente a CD27L purificado mediante adaptaciones de las técnicas descritas en Engvall y otros, *Immunochem.* 8:871, 1971 y en la Patente de EE.UU. 4.703.004. Células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones BALB/c singeneicos para producir ascitis que contiene altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-CD27L. Alternativamente, las células de hibridoma pueden hacerse crecer in vitro en matraces o botellas giratorias mediante diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis de ratón pueden purificarse mediante precipitación con sulfato amónico, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, también puede usarse cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a proteína A o proteína G, como también cromatografía de afinidad basada en la unión a CD27L. 50 55 60 65

Ejemplo 6

Unión de CD27L a CD27

5 Para comparar la unión de CD27 al CD27L natural expresado en células MP-1 con la del CD27L clonado expresado en células CV-1/EBNA transfectadas, se previó un ensayo de unión indirecta modificado usando la CD27/Fc y los ¹²⁵I-anticuerpos anti-(IgG humana) de ratón descritos en el Ejemplo 2. Esto era necesario debido a que el radiomarcaje directo de CD27/Fc daba como resultado su inactivación. Las células MP-1 se expusieron a concentraciones variables de CD27/Fc, seguido por una concentración saturante constante de ¹²⁵I-anticuerpo contra la porción Fc de la molécula, como sigue.

15 Los ensayos de unión para células MP-1 se efectuaron haciendo crecer células en cultivo en suspensión en placas de cultivo de 96 pocillos. Brevemente, células MP-1 (2×10^6 células/pocillo) se incubaron en presencia o ausencia de diversas concentraciones de CD27/Fc en medio de unión (medo RMPI 1640, albúmina de suero bovino al 1%, azida sódica al 0,2% y Hepes 20 mM, pH 7,2) durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron a continuación una vez con PBS y se incubaron con ¹²⁵I-anti-(IgG humana) de ratón (40 mg/ml) en medio de unión con agitación suave durante 1 hora a 37°C. Las células y el ¹²⁵I-anticuerpo no unido se separaron mediante el método de separación con aceite de ftalato, esencialmente como se describe por Dower y otros, *J. Immunol.* 132:751 (1984).

20 Monocapas de células CV-1/EBNA ($2,5 \times 10^5$ células por pocillo) transfectadas con las fracciones reunidas de cDNA de MP-1 se ensayaron con respecto a la expresión de CD27L después de dos días usando la unión a anti-(IgG humana) de ratón y autorradiografía de portaobjetos. Las monocapas de células transfectadas se lavaron con medio de unión que contenía leche desnatada en polvo (50 mg/ml; BM-NFDM), y a continuación se incubaron con CD27/Fc en BM-NFDM (1 µg/ml) durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron a continuación tres veces con BM-NFDM y se incubaron con 40 mg/ml de ¹²⁵I-anti-(IgG humana) de ratón en BM-NFDM durante una hora. Las células se lavaron dos veces con BM-NFDM, tres veces con PBS y se fijaron en PBS que contenía glutaraldehído al 2,5% durante 30 minutos, se lavaron dos veces más con PBS y se secaron al aire. Los portaobjetos de cámara se sumergieron a continuación en emulsión fotográfica Kodak GTNB-2 y se expusieron durante 3 días a temperatura ambiente antes de revelar.

30 Para ensayos de unión sobre el CD27L clonado, células CV-1/EBNA adherentes se transfectaron con el plásmido de expresión de CD27L en placas de 12 pocillos ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo) como anteriormente. Dos días más tarde las células se lavaron con BM-NFDM y se incubaron con diversas concentraciones de CD27/Fc. Subsiguientemente, las células se lavaron, se incubaron con ¹²⁵I-anticuerpo anti-(IgG humana) de ratón según se describe previamente y se recogieron mediante tripsinización. En todos los ensayos, la unión no específica de ¹²⁵I-anticuerpo se ensayó en ausencia de CD27/Fc así como en presencia de CD27/Fc y un exceso molar de 200 veces de anticuerpo no marcado. ¹²⁵I-anticuerpo libre y unido a células se cuantificó en un Packard Autogamma Counter. Los cálculos de afinidad se generaron en RS/1 (BBN Software, Boston, MA) ejecutado en un ordenador Microvax.

40 Cuando los datos de unión a MP-1 se representaban de nuevo en el sistema de coordenadas de Scatchard, se generaba una curva bifásica que indicaba componentes de unión tanto de alta como de baja afinidad. El CD27L expresado en células MP-1 tenía valores de K_a de $1,58 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $1,83 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, con 250 y 560 sitios por célula, respectivamente. De forma similar, el CD27L clonado expresado en células CV-1/EBNA demostraba componentes de unión de afinidad tanto alta como baja. Las constantes de afinidad generadas a partir de análisis de Scatchard, $2,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, se adaptan bien a las observadas para la unión de CD27/Fc al ligando natural expresado en células MP-1. Globalmente, la expresión del ligando se potenciaba en células CV-1/EBNA con 12.017 sitios de unión de alta afinidad y 68.560 de baja afinidad por célula detectada.

Ejemplo 7

50

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Presencia de SDS de CD27L

55 Se analizó proteína de CD27L natural y recombinante mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras como sigue. Las células se marcaron superficialmente con ¹²⁵I según se describe previamente por Urdal y otros, (*J. Biol. Chem.* 263:2870 (1988)). Las proteínas de la membrana se solubilizaron con detergente en presencia de inhibidores de proteasa incluyendo yodoacetamida 100 mM. Se aisló CD27L mediante unión a CD27/Fc y proteína G-Sepharose (Armitage y otros, *Nature* 357:80, (1992)). Para eliminar la unión de CD27/Fc a receptores de Fc, los lisados de detergente se preclarificaron con 50 µg/ml de IgG humana y sueros de conejo y cabra al 5%. Las muestras se resuspendieron en tampón que contenía urea 4 M y 2-mercaptoetanol al 5% y se sometieron a electroforesis a través de gels de poliacrilamida en presencia de SDS (NOVEX) con un gradiente de 4-20%.

65 Las especies proteínicas predominantes observadas en células CV-1/EBNA que expresan tanto MP-1 como CD27L tenían un M_r aparente de ~50.000. La comparación con el M_r calculado (21.146) del CD27L no modificado sugiere que se usan los sitios de glicosilación conectados con N en el dominio extracelular. Los precipitados de ambas células también demostraban una especie proteínica secundaria de aproximadamente 20.000 que no se encontraba en células CV-1/EBNA de control. Esta podía ser bien CD27L no modificado o bien el producto de la degradación proteínica. También se observó una especie proteínica de ~200 kDa que se precipita específicamente usando CD27/Fc.

Ejemplo 8

*Actividad Biológica de CD27L*5 A. *CD27L Estimula la Proliferación de Células T*

La capacidad de CD27L para estimular la proliferación de células T de sangre periférica humana se mostró usando el siguiente ensayo de proliferación. Células T de sangre periférica humana se purificaron de PBMC reajustando con SRBC tratadas con hidrobromuro de bromuro de 2-aminoetilisotiouonio. Después de la lisis hipotónica de SRBC, los monocitos se ajustaron mediante adherencia a plástico durante 1 h a 37°C. Células T CD4⁺ y CD8⁺ se purificaron mediante agotamiento negativo de células CD8⁺ o CD4⁺, respectivamente, usando clasificación magnética de células de acuerdo con el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA). Las células clasificadas eran habitualmente >95% puras, según se determinaba mediante citometría de flujo. Las células T se cultivaron en placas de 96 pocillos a 10⁵ células por pocillo por triplicado durante 3 días en presencia de una concentración subóptima de fitohemaglutinina (0,1% v/v). También estaban presentes en los cultivos células CV-1/EBNA que se fijaban a los 2 días después de la transfección con paraformaldehído al 1% durante 5 minutos a 25°C. Los pocillos se sometieron a impulsos con 1 μCi de timidina tritiada durante las 8 horas finales de cultivo y se determinó la incorporación de c.p.m. Un antisero de IL-2 neutralizador, preparado en un conejo, se usó para bloquear la bioactividad de IL-2 con una dilución de 1:500, según se describió previamente por Alderson y otros, *J. Exp. Med.* 172:577 (1990).

La adición de células CV-1/EBNA que expresan CD27L a células T en presencia de una concentración subóptima de fitohemaglutinina (PHA) daba como resultado una incorporación de timidina mejorada, mientras que la adición de células CV-1/EBNA de control transfectadas con vector vacío no tenía efecto. Tan pocas como 100 células CV-1/EBNA que expresan CD27L eran suficientes para mejorar significativamente la proliferación en cultivos establecidos con 1 x 10⁵ células T. En contraste, en ausencia de coestimulación, CD27L no tenía efectos sobre la proliferación de células T.

Usando cuentas magnéticas para aislar subpoblaciones de células T, se determinó que CD27L coestimulaba la proliferación de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. Además, la inducción de la proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ por CD27L estaba inalterada por la presencia de un antisero neutralizador para IL-2, implicando que bajo estas condiciones de cultivo la proliferación de células T mediada por CD27L es independiente de IL-2. Así, CD27L bien aporta una señal proliferativa directa a al menos algunas células T o bien, alternativamente, esas citoquinas distintas a IL-2 pueden contribuir a la respuesta.

35 B. *CD27 Induce la Actividad Lítica de Células T*

Para caracterizar adicionalmente el efecto de CD27L sobre células T, se determinó su capacidad para afectar a la generación *in vitro* de células citolíticas en presencia o ausencia de lectina. Las condiciones de cultivo para medir la actividad citolítica eran como las descritas posteriormente para ensayos de proliferación, excepto que las células T se cultivaban durante 4 días en placas de 24 pocillos a 10⁶ células por pocillo usando una concentración fija (10⁵) de células CV-1/EBNA. Se usó un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 h para determinar la actividad citolítica de células cultivadas según se describe previamente (Alderson y otros, *J. Exp. Med.* 172:577 (1990)). Brevemente, células cultivadas se lavaron en medio de cultivo y fracciones de cultivo duplicadas se diluyeron en serie en placas de fondo en V de 96 pocillos. Como una célula diana, se usó la línea celular de tumor mürido P815 en presencia de PHA (0,6% v/v) para revelar células líticas independientemente de su especificidad. Una unidad lítica (LU) se definió como la fracción del cultivo inicial que da lugar a 50% de lisis de las células diana.

CD27L no tenía efecto estimulante sobre la actividad citolítica en ausencia de coestimulación, según se detectaba en un ensayo de citotoxicidad mediado por lectina. Sin embargo, la incubación de células T purificadas con CD27L en presencia de PHA subóptima daba como resultado la generación mejorada de células citolíticas en comparación con células cultivadas con PHA sola o PHA más células CV-1/EBNA de control. La actividad lítica inducida por CD27L sobre células T coestimuladas con PHA en este ensayo era comparable a la inducida por IL-2 (1100 y 800 unidades líticas (LU) por cultivo, respectivamente) y era más de diez veces mayor que la observada con células incubadas en presencia de PHA sola (61 LU) o PHA más células CV-1/EBNA de control (50 LU). El efecto de CD27L sobre la generación de células citolíticas también era evidente sobre una base por células efectoras (780 LU para 10⁶ células para CD27L + PHA en comparación con 71 LU para 10⁶ células para células CV-1/EBNA de control + PHA), implicando que además de apoyar la proliferación de células T, CD27L mejora la diferenciación de precursores de células T citolíticas.

60 Ejemplo 9

Construcción y Expresión de CD27L Soluble

Se construyó un DNA de CD27-L para expresar una proteína de fusión de CD27-L oligómera soluble denominada sCD27L-3. El constructo que codifica sCD27L-3 (mostrado en el N° ID SEC: 9 y el N° ID SEC: 10) contiene una secuencia líder (que comprende los aminoácidos -24 a -1), una secuencia de 37 aminoácidos que comprende un dominio de cremallera de leucina (que comprende los aminoácidos 3-35) y la región extracelular de CD27-L humano (que comprende los aminoácidos 39-193). Los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-2 y 36-38 eran residuos

ES 2 281 896 T3

no funcionales de sitios de restricción. El constructo se preparó usando métodos que son bien conocidos en la técnica para obtener un DNA que codifica la región extracelular de CD27-L. Brevemente, la región extracelular de CD27-L se amplificó a partir de un cDNA de CD27-L de longitud completa usando PCR. Los cebadores usados se derivaron de la región extracelular de CD27-L (N° ID SEC: 1, nucleótidos 222-245, para el cebador 5', y el complemento de nucleótidos 663-689 para el cebador 3') con adición de secuencias que codifican sitios de enzimas de restricción deseados (ACTAGT, que contiene un sitio *Spe* I, para el cebador 5', y GCGGCCGC, que contiene un sitio *Not* I, para el cebador 3'). El producto de PCR amplificado, que representa el dominio extracelular de CD27-L, se clonó en un vector SMAG (pDC206) cortado con *Spe* I/*Not* I. El vector SMAG es un derivado de pDC201 (Sims y otros, *Science* 241:585, 1988) que contiene la secuencia líder de IL-7 murina. El vector se amplificó, a continuación se cortó con *Spe* I y se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. La secuencia de nucleótidos que comprende la región de cremallera de leucina se sintetizó ligando múltiples oligonucleótidos derivados de la secuencia de aminoácidos conocida de la cremallera de leucina usando metodología estándar, y a continuación ligando con el vector SMAG cortado con *Spe* I, para formar un vector de expresión que comprende una secuencia líder de IL-7 murina (Namen y otros, *Nature* 333:571; 1988), un dominio de cremallera de leucina y el dominio extracelular de CD27-L. El vector de expresión se denominó pDC206/sCD27L-3.

pDC206/sCD27L-3 se cotransfectó en la línea celular de riñón de mono CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478) junto con un plásmido pSV4Neo. pSV3Neo (Mulligan y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:2072; 1981) es un plásmido que expresa el antígeno T de SV40, y así permite la replicación episomática del plásmido pDC206.

Una vez que se identifican las células que expresan el constructo de fusión, cultivos a gran escala de células transfectadas se hacen crecer para acumular sobrenadante a partir de células que expresan la proteína de fusión de CD27-L oligómera soluble (denominada sCD27L-3). sCD27L-3 en fluido sobrenadante se purifica mediante purificación por afinidad substancialmente como se describe en la Patente de EE.UU. 5.011.912. sCD27L-3 también puede purificarse usando otros métodos de purificación de proteínas, según se describe aquí. Geles de SDS teñidos con plata de la proteína de fusión de CD27-L oligómera soluble pueden prepararse para determinar la pureza. sCD27L-3 se une a CD27 soluble e inhibe la unión de CD27 soluble a células que expresan CD27-L, según se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 10

Actividad Biológica de CD27L Soluble

Este ejemplo ilustra una actividad biológica de sCD27L-3. Una forma soluble del antígeno CD27 de la superficie de linfocitos humanos se preparó substancialmente como se describe por Fanslow y otros, *J. Immunol.* 149:65 (1992), para formar un constructo de fusión de Fc dímero denominado CD27/Fc. CD27/Fc comprende la región extracelular de CD27 y una región Fc de una IgG₁ humana. sCD27L-3 inhibe la unión de CD27/Fc a células MP-1, una línea de células B transformada con virus de Epstein-Barr humana que expresa CD27-L endógeno.

Fluido sobrenadante acondicionado procedente de células CV-1/EBNA transfectadas con pDC206/sCD27L-3 se valoró en una placa de 96 pocillos. Una cantidad constante de CD27/Fc (1 μ g/pocillo) se añadió a cada pocillo, seguido por $1-2 \times 10^6$ células MP-1 por pocillo, en medio de unión (RPMI-1640 que contiene albúmina de suero bovino al 1%, azida sódica al 0,2% y Hepes 20 mM, pH 7,2). La placa se incubó a 37°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS, a continuación se formaron como pellas mediante centrifugación. Se añadió ¹²⁵I-(anti-Fc de IgG humana) de ratón a cada pocillo a una concentración constante y la placa se incubó durante 1 hora adicional a 37°C. El ¹²⁵I-(anti-Fc de IgG humana) de ratón se unía a la CD27/Fc que se unía a las células MP-1. Después de la incubación final, las células se recogieron sobre tubos que contienen aceite de ftalato para separar el ¹²⁵I-(anti-Fc de IgG humana) de ratón y la cantidad de radiactividad se cuantificó usando un contador gamma.

sCD27L-3 exhibía una inhibición dependiente de la dosis de la unión de CD27/Fc a células MP-1. Comparando la concentración a la que la inhibición de la unión de CD27/Fc está a 50% con respecto a la valoración de la inhibición por sCD27L-3, se estimaba que la concentración de sCD27L-3 en el medio acondicionado estaba entre 18 y 40 μ g/ml. Realizando esta comparación, se estimó que el PM de sCD27L-3 era 135 Kd (el PM estimado de la región extracelular de CD27-L era 45 Kd, multiplicado por tres para la formación de trímero), y se supuso que la unión de sCD27L-3 a CD27/Fc se producía con una relación molar. Se estimó que la K_i era 10 veces la K_a , que era $3 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, y se supuso que la concentración final era $1 \times 10^{-8} \text{ M}$. Los resultados demostraban que la suposición inicial de una concentración de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ era aproximadamente 10 veces demasiado baja, y una dilución 1:3 del fluido sobrenadante daba realmente una concentración estimada de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$.

ES 2 281 896 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una secuencia de DNA aislada que codifica un polipéptido de CD27L biológicamente activo que comprende la secuencia de aminoácidos 1-193 del N° ID SEC: 1 o una de sus formas truncadas que retiene la propiedad de unión a CD27.
- 10 2. Una secuencia de DNA aislada que codifica un polipéptido de CD27L soluble biológicamente activo que comprende la secuencia de aminoácidos 39-193 del N° ID SEC: 1 o una de sus formas truncadas que retiene la propiedad de unión a CD27.
- 15 3. Una secuencia de DNA aislada, en donde la secuencia de DNA se selecciona del grupo que consiste en:
 - 15 (a) cDNA que comprende la secuencia de nucleótidos 268-729 del N° ID SEC: 1;
 - 20 (b) una secuencia de DNA que es un complemento de un DNA que se hibrida al cDNA de (a) bajo condiciones de restricción severa, en donde el DNA complementario codifica un CD27L biológicamente activo capaz de unirse a CD27 y bien estimular la proliferación de células T o bien potenciar la diferenciación de precursores de células T citolíticas; y
 - 25 (c) una secuencia de DNA que está degenerada como resultado del código genético con respecto a una secuencia de DNA de (a) o (b), y que codifica un CD27L biológicamente activo capaz de unirse a CD27 y bien estimular la proliferación de células T o bien potenciar la diferenciación de precursores de células T citolíticas.
- 30 4. Un vector de expresión que comprende una secuencia de DNA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 5. Una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
- 40 6. Un procedimiento para preparar un polipéptido de CD27L, que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 5 bajo condiciones que promueven la expresión de CD27L, y recuperar el polipéptido de CD27L del cultivo.
- 45 7. Un polipéptido de CD27L codificado por una secuencia como la indicada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 50 8. Un polipéptido de CD27L que es al menos 80% idéntico a un polipéptido como el indicado en la reivindicación 7.
- 55 9. Un polipéptido de CD27L que es al menos 90% idéntico a un polipéptido como el indicado en la reivindicación 7.
- 60 10. Un polipéptido de CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde dicho polipéptido es un polipéptido soluble.
- 65 11. Un polipéptido de CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es homogéneo.
12. Un polipéptido de CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que dicho CD27L es CD27L humano.
13. Un polipéptido de CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que está purificado.
14. Un polipéptido de CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que el polipéptido de CD27L es un polipéptido de CD27L oligómero que comprende dos o más polipéptidos de CD27L fusionados entre sí.
15. Un anticuerpo inmunorreactivo con CD27L de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-13 o uno de sus fragmentos antigénicos.
16. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, que es un anticuerpo monoclonal.

ES 2 281 896 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Immunex Corporation
5 <120> LIGANDO DE CD27
<130> P18581EP
<140> EP93920446.7
<141> 1993-09-01
10 <150> US07/941,648
<151> 1992-09-08
<150> US08/106,507
<151> 1993-08-13
15 <160> 10
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
20 <211> 926
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<220>
25 <221> péptido maduro
<222> (151)..(729)
<220>
30 <221> CDS
<222> (151)..(732)

<400> 1
35 **ccagagaggg gcaggcttgt ccctgacag gttgaagcaa gtagacgcc aggagccccg 60**

 ggagggggct gcagtttctt tcttctcttc tcggcagcgc tccgcgccc catcgcctt 120

40 **cctgcgctag cggaggtgat cgccgcggcg atg ccg gag gag ggt tcg ggc tgc 174**
 Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys
 1 5

45 **tcg gtg cgg cgc agg ccc tat ggg tgc gtc ctg cgg gct gct ttg gtc 222**
 Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val
 10 15 20

50 **cca ttg atc gcg ggc ttg gtg atc tgc ctc gtg gtg tgc atc cag cgc 270**

55

60

65

ES 2 281 896 T3

Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg
 25 30 35 40

5 ttc gca cag gct cag cag cag ctg ccg ctc gag tca ctt ggg tgg gac 318
 Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp
 45 50 55

10 gta gct gag ctg cag ctg aat cac aca gga cct cag cag gac ccc agg 366
 Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg
 60 65 70

15 cta tac tgg cag ggg ggc cca gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga 414
 Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly
 75 80 85

20 cca gag ctg gac aag ggg cag cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac 462
 Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr
 90 95 100

25 atg gta cac atc cag gtg acg ctg gcc atc tgc tcc tcc acg acg gcc 510
 Met Val His Ile Gln Val Thr Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala
 105 110 115 120

30 tcc agg cac cac ccc acc acc ctg gcc gtg gga atc tgc tct ccc gcc 558
 Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala
 125 130 135

35 tcc cgt agc atc agc ctg ctg cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt acc 606
 Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr
 140 145 150

40 att gtc tcc cag cgc ctg acg ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc 654
 Ile Val Ser Gln Arg Leu Thr Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys
 155 160 165

45 acc aac ctc act ggg aca ctt ttg cct tcc cga aac act gat gag acc 702
 Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr
 170 175 180

50 ttc ttt gga gtg cag tgg gtg cgc ccc tga ccactgctgc tgattagggt 752
 Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg Pro
 185 190

55 tttttaaatt ttattttatt ttatttaagt tcaagagaaa aagtgtacac acaggggcca 812

cccgggggtg ggggtggagt gtgggtgggg gtagtgtgtg gcaggacaag agaaggcatt 872

60 gagctttttc tttcattttc ctatttaaaaa atacaaaaat caaaacaaaa aaaa 926

<210> 2

<211> 193

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 281 896 T3

<400> 2

Met Pro Glu Glu Gly Ser Gly Cys Ser Val Arg Arg Arg Pro Tyr Gly
 1 5 10 15
 Cys Val Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile
 5 20 25 30
 Cys Leu Val Val Cys Ile Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln Leu
 35 40 45
 Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn His
 50 55 60
 Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln Leu
 85 90 95
 Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr Leu
 100 105 110
 Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr Leu
 115 120 125
 Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu Arg
 130 135 140
 Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Val Ser Gln Arg Leu Thr Pro
 145 150 155 160
 Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu Leu
 165 170 175
 Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val Arg
 180 185 190
 Pro

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

35 <400> 3

atagcggccg cctgggcagg gaccatg

27

40 <210> 4

<211> 39

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

50 <400> 4

gtgaccggtg gggtttctag ggacctcggg tctagagcg

39

55 <210> 5

<211> 24

<212> DNA

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido

65 <400> 5

gatcttgaa cgagacgacc tgct

24

ES 2 281 896 T3

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido
10 <400> 6
aaccttgctc tgctggacga 20
15 <210> 7
<211> 46
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido
25 <400> 7
ctgtgggct cgcggtgag gacaaactct tcgcggtctt tccagt 46
30 <210> 8
<211> 46
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido
40 <400> 8
gacaaccga gcgccaactc ctgttgaga agcgccagaa aggtca 46
<210> 9
45 <211> 689
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: trímero del ligando de CD27 (CD27L-3)
<220>
<221> CDS
55 <222> (39)..(689)
<220>
<221> péptido de señal
<222> (39)..(110)
60 <220>
<221> péptido maduro
<222> (111)..(686)
65

ES 2 281 896 T3

<400> 9

```

ggaaaactct cgaggtacct atcccgggga tccccacc atg ttc cat gtc tct ttt 56
                                     Met Phe His Val Ser Phe
5                                     -20
aga tat atc ttt gga att cct cca ctg atc ctt gtt ctg ctg cct gtc 104
Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu Ile Leu Val Leu Leu Pro Val
                                     -15      -10      -5
10 act agt tct gac cgt atg aaa cag ata gag gat aag atc gaa gag atc 152
Thr Ser Ser Asp Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile
   -1  1                5                10
cta agt aag att tat cat ata gag aat gaa atc gcc cgt atc aaa aag 200
Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys
   15                20                25                30
20 ctg att ggc gag cgg act agt cag cgc ttc gca cag gct cag cag cag 248
Leu Ile Gly Glu Arg Thr Ser Gln Arg Phe Ala Gln Ala Gln Gln Gln
                35                40                45
ctg ccg ctc gag tca ctt ggg tgg gac gta gct gag ctg cag ctg aat 296
Leu Pro Leu Glu Ser Leu Gly Trp Asp Val Ala Glu Leu Gln Leu Asn
                50                55                60
25 cac aca gga cct cag cag gac ccc agg cta tac tgg cag ggg ggc cca 344
His Thr Gly Pro Gln Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Trp Gln Gly Gly Pro
                65                70                75
30 gca ctg ggc cgc tcc ttc ctg cat gga cca gag ctg gac aag ggg cag 392
Ala Leu Gly Arg Ser Phe Leu His Gly Pro Glu Leu Asp Lys Gly Gln
   80                85                90
35 cta cgt atc cat cgt gat ggc atc tac atg gta cac atc cag gtg acg 440
Leu Arg Ile His Arg Asp Gly Ile Tyr Met Val His Ile Gln Val Thr
   95                100                105                110
40 ctg gcc atc tgc tcc tcc acg acg gcc tcc agg cac cac ccc acc acc 488
Leu Ala Ile Cys Ser Ser Thr Thr Ala Ser Arg His His Pro Thr Thr
                115                120                125
45 ctg gcc gtg gga atc tgc tct ccc gcc tcc cgt agc atc agc ctg ctg 536
Leu Ala Val Gly Ile Cys Ser Pro Ala Ser Arg Ser Ile Ser Leu Leu
                130                135                140
50 cgt ctc agc ttc cac caa ggt tgt acc att gtc tcc cag cgc ctg acg 584
Arg Leu Ser Phe His Gln Gly Cys Thr Ile Val Ser Gln Arg Leu Thr
                145                150                155
55 ccc ctg gcc cga ggg gac aca ctc tgc acc aac ctc act ggg aca ctt 632
Pro Leu Ala Arg Gly Asp Thr Leu Cys Thr Asn Leu Thr Gly Thr Leu
   160                165                170
60 ttg cct tcc cga aac act gat gag acc ttc ttt gga gtg cag tgg gtg 680
Leu Pro Ser Arg Asn Thr Asp Glu Thr Phe Phe Gly Val Gln Trp Val
   175                180                185                190

60 cgc ccc tga
   Arg Pro

```

<210> 10

<211> 216

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

