



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 009**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01106317 .9**

86 Fecha de presentación : **12.12.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **1114864**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2001**

54

Título: **Antígenos de la superficie celular de mamíferos, reactivos relacionados.**

30

Prioridad: **13.12.1996 US 32846 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73

Titular/es: **Schering Corporation**  
**2000 Galloping Hill Road**  
**Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US**

72

Inventor/es: **Gorman, Daniel M. y**  
**Mattson, Jeanine D.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 305 009 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

Antígenos de la superficie celular de mamíferos, reactivos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones relacionadas con proteínas que funcionan en el control de la activación y expansión de células de mamífero, por ejemplo células del sistema inmune de un mamífero. En particular, proporciona genes purificados, proteínas, anticuerpos y reactivos relacionados, útiles por ejemplo, para regular la  
10 activación, desarrollo, diferenciación y función de diversos tipos de células que incluyen células hematopoyéticas.

**Antecedentes de la invención**

La activación de células T en reposo es crítica para la mayoría de las respuestas inmunes y permite a estas células ejercer sus capacidades reguladoras o efectoras. Véase Paul (ed; 1993) *Fundamental Immunology* 3<sup>rd</sup>. ed., Raven Press, N.Y. El aumento de la adhesión entre células T y las células presentadoras de antígenos (denominadas en lo sucesivo abreviadamente APC por la expresión inglesa *Antigen Presenting Cells*) u otras formas de estímulos primarios, por ejemplo anticuerpos monoclonales (mAb) inmovilizados, puede potenciar las señales de los receptores de células T. La activación de células T y la expansión de células T, depende del acoplamiento de los receptores de células T  
20 (abreviadamente en lo sucesivo TCR por la expresión inglesa *T-Cell Receptors*) y señales co-estimuladoras provistas por células accesorias. Véase, por ejemplo, Jenkins and Johnson (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:361-367; Bierer and Hahn (1993) *Semin. Immunol.* 5:249-261; June *et al.* (1990) *Immunol. Today* 11:211-216; y Jenkins (1994) *Immunity* 1:443-446. Una interacción co-estimuladora principal y bien estudiada para las células T implica CD28 o CTLA-4 sobre células T con B7 o con B70 (Jenkins (1994) *Immunity* 1:443-446). Estudios recientes sobre ratones deficientes en  
25 CD28 (Shahinian *et al.* (1993) *Science* 81:609-612; Green *et al.* (1994) *Immunity* 1:501-508 y ratones transgénicos que expresan la inmunoglobulina CTLA-4 (Ronchese *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:809-817) han revelado deficiencias en algunas respuestas de las células T, aunque estos ratones tiene respuestas inmunes principales normales y respuestas de CTL normales al virus de la coriomeningitis linfocítica y el virus de la estomatitis vesicular. Como resultado, ambos estudios llegan a la conclusión que otras moléculas co-estimuladoras deben estar apoyando la función de las células  
30 T. Sin embargo, ha sido difícil la identificación de estas moléculas que median distintas señales co-estimuladoras.

El factor de necrosis tumoral (abreviadamente en lo sucesivo TNF por sus iniciales en inglés *Tumoral Necrosis Factor*) es el miembro prototípico de una familia emergente de citoquinas que funcionan como mediadores prominentes de la regulación inmune y la respuesta inflamatoria. Estos ligandos típicamente proteínas de membrana del tipo II, con homología en el extremo carboxilo. Se produce frecuentemente una proteína soluble procesada proteolíticamente. Véase, por ejemplo, Smith *et al.* (1994) *Cell* 76:959-962; Armitage (1994) *Current Opinion in Immunology* 6:407-413; Gruss and Dower (1995) *Blood* 85:3378-3404; Wiley *et al.* (1995) *Immunity* 3:873-682) y Baker and Reddy (1996) *Oncogene* 12:1-9. Las funciones cruciales de estos miembros de la familia son puestas en evidencia por diversos estudios, y están implicados en la regulación de la apoptosis, la tolerancia periférica, la maduración de Ig y la  
40 conmutación de isotipos, y las funciones generales de las células B y las células T. Véase, por ejemplo, Thomson (ed. 1994) *The Cytokine Handbook*, Academic Press, San Diego, CA. Esto implica funciones fundamentales en las redes inmunes y de desarrollo.

La incapacidad para modular las señales de activación evita el control de respuestas de desarrollo o fisiológicas inapropiadas en el sistema inmune. La presente invención proporciona por lo menos una molécula co-estimuladora alternativa, cuyos agonistas y antagonistas serán útiles en modular un gran número de respuestas inmunes.

**Sumario de la invención**

La presente invención está basada en parte, en el descubrimiento de un antígeno que exhibe homología de secuencia con proteínas que actúan como inductores de la apoptosis. En particular, proporciona un gen que codifica una proteína de 316 aminoácidos, denominada 499E9, que es expresada en células T del tipo Th1 altamente polarizadas. El acoplamiento de 499E9 puede modular la proliferación específica de antígenos y la producción de citoquinas por parte de las células efectoras. La 499E9 es una nueva molécula de la superficie celular, que cuando se acopla puede potenciar la expansión del sistema inmune o la apoptosis. Se describe la realización de ratón que facilita la obtención de genes, proteínas y anticuerpos de mamíferos y sus usos. Están disponibles equivalentes funcionales que presentan una homología de secuencia significativa, por ejemplo, con otros mamíferos, por ejemplo, ser humano. Además el receptor de 499E9 puede funcionar como pareja (o socio) de unión para estimular otras células que expresan el receptor.

Más particularmente la presente invención proporciona una composición seleccionada de: una proteína o péptido 499E9 sustancialmente pura o recombinante que exhibe por lo menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia en una longitud de por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos con la SEQ ID NO: 2; una 499E9 de secuencia natural de SEQ ID NO: 2; o una proteína de fusión que comprende la secuencia de 499E9. También se describe en la presente memoria una proteína aislada o sustancialmente pura, que comprende un segmento que exhibe identidad de  
65 secuencia con una porción correspondiente de una 499E9, en donde la homología es por lo menos aproximadamente 90% de identidad y la porción es por lo menos aproximadamente 9 aminoácidos; la homología es por lo menos aproximadamente 80% de identidad y la porción es por lo menos aproximadamente 17 aminoácidos; o la homología es por lo menos aproximadamente 70% de identidad y la porción es de por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos.

## ES 2 305 009 T3

Otras realizaciones incluyen una composición, en donde la 499E9 comprende una secuencia madura de la Tabla 1; o una proteína o péptido: es de un animal de sangre caliente seleccionado de un mamífero, incluyendo un roedor; comprende por lo menos un segmento polipeptídico de SEQ ID NO: 2; exhibe una pluralidad de porciones que exhiben la identidad; es una variante alélica natural de 499E9; tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos; exhibe por lo menos dos epítomos no solapantes que son específicos para una 499E9 de mamífero; exhibe una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% sobre una longitud de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos con una 499E9 de roedor; exhibe por lo menos dos epítomos no solapantes que son específicos para una 499E9 de roedor; exhibe una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 90% en una longitud de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos con una 499E9 de roedor; está glicosilada; es un polipéptido sintético; se une a un sustrato sólido; se conjuga con otro resto químico; tiene un sustitución de 5 veces o menos respecto a la secuencia natural; o es una variante de inserción o deleción de una secuencia natural. También se proporcionan varias composiciones, por ejemplo, que comprenden: una proteína o péptido 499E9 y un vehículo, en donde el vehículo es: un compuesto acuoso que incluye agua, solución salina y/o tampón; y/o formulada para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral. Se proporcionan proteínas de fusión, por ejemplo, que comprenden: la secuencia de proteína madura de la Tabla 1; una cola o marcador de detección o purificación que incluye una secuencia FLAG, His6 o Ig; o secuencia de otra proteína TNF-ligando. Se proporcionan realizaciones de kits, por ejemplo, que comprende dicha proteína o polipéptido, y: un compartimento que comprende la proteína o polipéptido y/o instrucciones para uso o desecho de los reactivos del kit.

Las realizaciones de anticuerpo o compuesto de unión incluyen las que comprenden una porción de unión al antígeno desde un anticuerpo, que específicamente se une a una proteína 499E9 natural, en donde: la proteína es una proteína de roedor; el compuesto de unión es un fragmento Fv, Fab o Fab2; el compuesto de unión se conjuga con otra porción química; o el anticuerpo: es producido contra una secuencia peptídica de un polipéptido maduro que comprende la secuencia de la Tabla 1; es producido contra una secuencia 499E9 madura; es producido para 499E9 purificada: es inmunoseleccionado; es un anticuerpo policlonal; se une a una 499E9 desnaturalizada; exhibe una Kd para el antígeno de por lo menos 30  $\mu$ M; se une a un sustrato sólido, incluyendo una bolita o membrana de plástico; está en una composición estéril; o está marcado detectablemente, incluyendo un marcador radiactivo o fluorescente. Otras realizaciones incluyen un kit que comprende el compuesto de unión, es decir, su fragmento de unión al antígeno o al anticuerpo, y: un compartimento que comprende el compuesto de unión; y/o instrucciones para el uso o desecho de los reactivos en el kit. Otras formas incluyen, por ejemplo una composición que comprende: un compuesto de unión estéril; o el compuesto de unión es decir, su fragmento de unión al antígeno o al anticuerpo y un vehículo, en donde el vehículo es: un compuesto acuoso incluyendo agua, solución salina y/o tampón, y/o formulada para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral. Tales características también permiten métodos de purificar una proteína o péptido 499E9 de otros materiales de una mezcla, que comprende poner en contacto la mezcla con dicho anticuerpo y separar la 499E9 unida de otros materiales.

Las realizaciones de ácidos nucleicos incluyen un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica una proteína o péptido o una proteína de fusión, en donde: la proteína 499E9 es de un mamífero, incluyendo un roedor; o el ácido nucleico: codifica una secuencia de péptido antigénico de la Tabla 1; codifica una pluralidad de secuencias de péptidos antigénicos de la Tabla 1; exhibe al menos aproximadamente 80% de identidad con un cDNA natural que codifica el segmento; es un vector de expresión; comprende además un origen de replicación; procede de una fuente natural; comprende un marcador detectable; comprende una secuencia nucleotídica sintética; tiene un tamaño menor de 6 kb, preferiblemente menor que 3 kb; es de un mamífero, incluyendo un roedor; comprende una secuencia codificadora natural de longitud completa; es una sonda de hibridación para un gen que codifica la proteína 499E9; o es un cebador de PCR, producto de PCR o cebador de mutagénesis. Una célula o tejido que comprende dicho ácido nucleico recombinante están también abarcados dentro de la invención, por ejemplo, en donde la célula es: una célula procarionota; una célula eucariota; una célula bacteriana; una célula de levadura; una célula de insecto; una célula de ratón; una célula de roedor; o una célula humana. Las formas de kit incluyen las que comprenden el ácido nucleico, y: un compartimento que comprende el ácido nucleico; un compartimento adicional que comprende una proteína o polipéptido 499E9; y/o instrucciones para uso o desecho de los reactivos del kit. También se describen en la presente memoria otras realizaciones de ácidos nucleicos incluyendo aquellas que: se hibridan en condiciones de lavado de: 30°C y menos de sal 2M, 45°C y/o sal 500 mM, o a 35°C y/o sal 150 mM a la SEQ ID NO: 1; o exhiben al menos aproximadamente 85% de identidad sobre un tramo por lo menos de 30 nucleótidos, por lo menos de 90% y/o el tramo es por lo menos de 55 nucleótidos, o por lo menos 95% y/o el tramo es por lo menos de 75 nucleótidos con una 499E9 de roedor.

La invención se refiere además a métodos de modular la fisiología o desarrollo de un cultivo de una célula o tejido que comprenden introducir en la célula un agonista o antagonista de 499E9. Otros métodos incluyen modular la fisiología de una célula que comprenden poner en contacto la célula con: una 499E9 o fragmento de la misma sustancialmente puro; un anticuerpo o pareja de unión que se une específicamente a 499E9, o un ácido nucleico que codifica una 499E9 o uno de sus péptidos. Preferiblemente la célula es una célula T y la modulación de la fisiología es: apoptosis de la célula T; o activación de la célula T.

La invención también se refiere a un método de tratar un paciente que tiene una respuesta inmune anormal, administrándole una dosis eficaz de un anticuerpo o pareja de unión específica para 499E9; una proteína o polipéptido de 499E9; o un ácido nucleico que codifica un péptido de 499E9. La respuesta inmune anormal se caracteriza por una deficiencia inmune de células T; inflamación crónica; o rechazo de tejidos.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas****I. Generalidades**

5 La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y secuencias de DNA que codifican varias proteínas de mamífero que son antígenos encontrados en muchos subtipos de células T, por ejemplo, Th1, Th2, células Th1 polarizadas y células Th2 polarizadas. Entre estas proteínas están antígenos que modulan, por ejemplo, inducen o evitan la proliferación o diferenciación de células que interactúan entre sí, entre otros efectos fisiológicos. Los antígenos de longitud completa, y sus fragmentos o antagonistas serán útiles en la modulación fisiológica de células que expresan receptores contrarios para el antígeno. Las proteínas también serán útiles como antígenos, por ejemplo inmunógenos, para producir anticuerpos para diversos epítopos situados en esta proteína, tanto epítopos lineales como conformacionales. La molécula puede ser de utilidad en definir subconjuntos funcionales de células T o de células asesinas naturales (abreviadamente células NK por la expresión inglesa *natural killer*).

15 Un cDNA que codifica 499E9 se aisló de una genoteca de células Th1 polarizadas, véase Openshaw *et al.* (1995) *J. Exp. Med.* 182:1357-1367. El cDNA de 499E contiene un tramo de aproximadamente 2191 pb de longitud y contenía un marco de lectura abierto grande que codifica una proteína transmembranal del tipo II. El análisis del material transcrito ha identificado múltiples transcritos, siendo los más prevalentes los de 2,1 a 2,3 kb. Las características estructurales incluyen una secuencia de dominio intracelular de aproximadamente 52 aminoácidos, una región extracelular de aproximadamente 246 aminoácidos y una porción que abarca la membrana, presuntamente hidrófoba, de aproximadamente 20 aminoácidos. Véase la Tabla 1 y la SEQ. ID NO: 2. 499E9 exhibe motivos estructurales característicos de un miembro de la familia de ligandos de TNF. Compárese, por ejemplo, con el ligando CD40, el ligando OX40, TNF, NGF y FAS. La Tabla 1 ilustra las secuencias de ácidos nucleicos y la secuencia predicha de aminoácidos para 499E9 de ratón.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 305 009 T3

TABLA 1

Secuencia de nucleótidos y secuencia predicha de aminoácidos para 499E9 de ratón. La secuencia del dominio intracelular predicho se extiende alrededor de met1 a met49; los residuos 8 y 11 son sitios potenciales de fosforilación de tirosina; una secuencia transmembranal se extiende probablemente alrededor de phe50 a leu69; y el dominio extracelular se extiende probablemente alrededor de tyr70 a asp316. Véanse las SEQ ID NO: 1 y 2.

10	<b>GCCAGGACCT CTGTGAACCG GTCGGGGCGG GGGCCGCCTG GCCGGGAGTC TGCTCGGCGG</b>
	<b>60</b>
15	<b>TGGGTGGCCG AGGAAGGGAG AGAACGATCG CGGAGCAGGG CGCCCGAACT CCGGGCGCCG</b>
	<b>120</b>
20	<b>CGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG</b>
	<b>169</b>
	<b>Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser</b>
	<b>1 5 10 15</b>
25	<b>GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC</b>
	<b>217</b>
	<b>Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His</b>
	<b>20 25 30</b>
30	<b>CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC</b>
	<b>265</b>
	<b>Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg</b>
	<b>35 40 45</b>
35	<b>TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC</b>
	<b>313</b>
	<b>Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys</b>
	<b>50 55 60</b>
40	<b>AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA</b>
	<b>361</b>
	<b>Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg</b>
	<b>65 70 75</b>
45	<b>ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT</b>
	<b>409</b>
	<b>Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His</b>
	<b>80 85 90 95</b>
50	<b>GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA</b>
	<b>457</b>
	<b>Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu</b>
	<b>100 105 110</b>
55	
60	
65	

ES 2 305 009 T3

5 CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG  
 505  
 Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln  
 115 120 125

10 AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA  
 553  
 Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro  
 130 135 140

15 GCT ATG ATG GAA GGC TCA TGG TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT  
 601  
 Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro  
 145 150 155

20 GAG GCC CAG CCA TTT GCA CAC CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA  
 649  
 Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro  
 160 165 170 175

25 TCG GGT TCC CAT AAA GTC ACT CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC  
 697  
 Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly  
 180 185 190

30 TGG GCC AAG ATC TCT AAC ATG ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT  
 745  
 Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val  
 195 200 205

35 AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT  
 793  
 Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His  
 210 215 220

40 CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG  
 841  
 His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val  
 225 230 235

45 TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG  
 889  
 Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met  
 240 245 250 255

50 AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT  
 937  
 Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe  
 260 265 270

55 TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA  
 985  
 Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu  
 275 280 285

ES 2 305 009 T3

ATT AGC ATT CAG GTG TCC AAC CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT  
 1033  
 Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp  
 5                   290                                   295                                   300

GCG ACG TAC TTT GGG GCT TTC AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT  
 1082  
 Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp  
 10                   305                                   310                                   315

TTCGTGGAAC ATTAGCATGG ATGTCCTAGA TGTTTGGAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT  
 15 1142

GTC TATA CAT GTGTAAGACT ACTAAGAGAC ATGGCCCACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC  
 20 1202

TCTCTCTTGA GCCTGTACAG GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTCAT  
 25 1262

GGTGATTACA CAACGGTTTT ACAATTTTGT AATGATTTCC TAAGAATTGA ACCAGATTGG  
 30 1322

GAGAGGTATT CCGATGCTTA TGAAAACTT ACACGTGAGC TATGGAAGGG GGTACAGTC  
 35 1382

TCTGGGTCTA ACCCCTGGAC ATGTGCCACT GAGAACCTTG AAATTAAGAA GATGCCATGT  
 40 1442

CATGCAAAG AAATGATAGT GTGAAGGGTT AAGTTCTTTT GAATTGTTAC ATTGCGCTGG  
 45 1502

GACCTGCAA TAAGTTCTTT TTTTCTAATG AGGAGAGAAA AATATATGTA TTTTATATA  
 50 1562

ATGTCTAAAG TTATATTTCA GGTGTAATGT TTTCTGTGCA AAGTTTGTGA AATTATATTT  
 55 1622

GTGCTATAGT ATTTGATTCA AAATATTTAA AAATGTCTCA CTGTTGACAT ATTTAATGTT  
 60 1682

TTAAATGTAC AGATGTATTT AACTGGTGCA CTTTGTAAAT CCCCTGAAGG TACTCGTAGC  
 65 1742

TAAGGGGGCA GAATACTGTT TCTGGTGACC ACATGTAGTT TATTTCTTTA TTCTTTTAA  
 70 1802

CTTAATAGAG TCTTCAGACT TGTCAAAAC TATGCAAGCAA AATAAATAAA TAAAAATAAA  
 75 1862

ATGAATATCT TGAATAATAA GTAGGATGTT GGTACCAGG TGCCTTTCAA ATTTAGAAGC  
 80 1922

TAATTGACTT TAGGAGCTGA CATAGCCAAA AAGGATACAT AATAGGCTAC TGAAAATCTG  
 85 1982

**TCAGGAGTAT TTATGCAATT ATTGAACAGG TGTCTTTTTT TACAAGAGCT ACAAATTGTA  
2042**

**AATTTTGTTF CTTTTTTTTTC CCATAGAAAA TGTACTATAG TTTATCAGCC AAAAAACAAT  
2102**

**CCACTTTTTTA ATTTAGTGAA AGTTATTTTA TTATACTGTA CAATAAAAGC ATTGTTTCTG  
2162**

**AATGGCATT TTTGGTACTT AAAAAATGGC  
2191**

Los miembros de la familia de ligandos han conservado un residuo de leucina correspondiente al residuo 205; un residuo de glicina conservado correspondiente al residuo 211; un residuo de tirosina conservado correspondiente el residuo 216; un residuo de guanina conservado correspondiente al residuo 277; un residuo de leucina conservado correspondiente al residuo 282; un residuo de fenilalanina conservado correspondiente al residuo 307; y un residuo de glicina conservado correspondiente al residuo 308. El dominio de ligandos de TNF parece extenderse desde 205 (Ieu) hasta 316 (asp). Los sitios de glicosilación parecen estar en 197 y 262. Este clon exhibe estrecha homología con una TRAIL de ratón, que está implicado en la inducción de la apoptosis. Miembros relacionados de la familia incluyen los ligandos para CD40 y FAS y beta-linfotoxina, factor de necrosis tumoral. etc.

Por medio de análisis Southern de cDNA es claro que 499E9 es expresada en muchas células T. incluyendo Th1. Th2, células Th1 o Th2 polarizadas de 3 semanas, pre-células T, y en genotecas de cDNA de timo desactivadas (*knock-out*). Puede haber sido detectada alguna señal débil procedente de células dendríticas. Las células que expresan 499E9 contienen típicamente un transcrito principal de aproximadamente 2,1 a 2,3 kb, pero también contienen otros transcritos. El análisis de distribución en tejidos sugiere una señal positiva en cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo y testículos. No se han detectado transcritos para 499E9 en fibroblastos (células L), monocitos (RAW264), células T naturales (naive) (células CD4+, MEL14+, Br), células de macrófagos, pulmón/hígado/bazo infectados con Nippo, u órganos desactivados (*knock-out*) con Rag (cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo o testículos).

La homología estructural de 499E9 con la familia de ligandos de TNF, sugiere la función de esta molécula. 499E9, como una molécula de superficie de células T, probablemente modula respuestas proliferativas específicas de Ag sobre células efectoras o la inducción de la apoptosis en estas células. Los agonistas o antagonistas de 499E9 pueden actuar también como una molécula co-estimuladora para la regulación de la activación celular mediada para células T, y de hecho pueden causar un cambio de los tipos de células T coadyuvantes, por ejemplo entre Th1 y Th2. Por tanto, 499E9 o sus antagonistas deben ser de utilidad en el tratamiento de trastornos inmunes anormales, por ejemplo deficiencias inmunes de células T, inflamación crónica o rechazo de tejidos.

Las moléculas ligandos de TNF modulan típicamente la proliferación, la viabilidad y la diferenciación celulares. Por ejemplo, TNF y FAS pueden destruir células que expresan sus receptores específicos incluyendo fibroblastos, células hepáticas y linfocitos. Algunos miembros de esta clase de ligandos exhiben efectos sobre la proliferación celular de las células que expresan sus receptores respectivos, por ejemplo células B que expresan CD40. Estos efectos sobre la proliferación pueden también efectuar subsiguiente etapas de diferenciación, y pueden conducir, directa o indirectamente, a cambios en los perfiles de expresión de citoquinas.

Los miembros de la familia de ligandos de TNF exhiben también efectos de co-estimulación, que también pueden regular la diferenciación celular o la apoptosis. Las células que expresan receptores pueden ser protegidas de la muerte celular inducido por activación (abreviadamente AICD por las iniciales en inglés *Activation Induced Cell Death*) o apoptosis. Por ejemplo, el ligando CD40 puede tener efectos sobre los linfocitos T y B.

La realización caracterizada en la presente memoria es de ratón, pero existirán otras variantes de primates, por ejemplo, de seres humanos. También estarán disponibles secuencias adicionales para proteínas en otras especies de mamífero, por ejemplo primates y roedores. Véase más adelante. Las descripciones que siguen están dirigidas, con fines ilustrativos, a 499E9, pero son igualmente aplicables a realizaciones relacionadas de otras especies.

La proteína 499E9 de ratón es una proteína que exhibe rasgos estructurales característicos de antígenos de la superficie celular, por ejemplo un miembro de la familia de ligandos del TNF. La proteína es detectada fácilmente sobre tipos celulares particulares, otras expresan cantidades menores. El antígeno de 499E9 debe estar presente en los tipos de tejidos identificados y la interacción del antígeno con su pareja de unión debe ser importante para mediar varios aspectos de fisiología o desarrollo celular, tal como se describe.



## II. 499E9 purificada

La secuencia de aminoácidos de 499E9 de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 2. Estas secuencias de aminoácidos, provistas de los extremos amino hasta carboxilo, son importantes en proporcionar información de secuencias en el antígeno, permitiendo distinguir la proteína de otras proteínas y poner como ejemplo numerosas variantes. Además, las secuencias peptídicas permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos para reconocer dichos segmentos, y las secuencias de nucleótidos permiten la preparación de sondas de oligonucleótidos, siendo las dos estrategias para detección o aislamiento, por ejemplo, clonación de genes o los cDNA que codifican dichas secuencias.

Como se usa en la presente memoria, el término “499E9 de ratón” abarcará cuando se usa en un contexto de proteínas, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, o un fragmento significativo de dicha proteína, u otra proteínas altamente homólogas derivadas de ratón. Estos componentes de unión, por ejemplo anticuerpos, se unen típicamente a 499E9 con alta afinidad, por ejemplo por lo menos aproximadamente 100 nM, usualmente más de aproximadamente 30 nM, preferiblemente más de aproximadamente 10 nM, y más preferiblemente como lo mejor aproximadamente 3 nM. Proteínas homólogas se encontrarían en especies de mamífero diferentes de ratón, por ejemplo primates o roedores. Las especies que no son de mamífero deben poseer genes y proteínas relacionados estructuralmente o funcionalmente por ejemplo, aves y anfibios.

El término “polipéptido” tal y como se usa en la presente memoria incluye un fragmento o segmento significativo, y abarca un tramo de residuos de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos, típicamente por lo menos aproximadamente 16 aminoácidos, de preferencia por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos y en realizaciones particularmente preferidas, por lo menos aproximadamente 30 o más aminoácidos.

El término “composición de unión” se refiere a moléculas que se unen con especificidad a 499E9, por ejemplo, en una forma de tipo de apareamiento por adhesión celular o una interacción antígeno-anticuerpo. También incluye compuestos por ejemplo, proteínas, que se asocian específicamente con 499E9, incluyendo una interacción natural proteína-proteína fisiológicamente relevante, covalente o no covalente. La molécula puede ser un polímero o reactivo químico. Un análogo funcional puede ser un antígeno con modificaciones estructurales o puede ser una molécula que tenga una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión apropiados. Los compuestos pueden servir como agonistas o antagonistas de la interacción de unión, véase por ejemplo Goodman *et al.* (eds) (1990) *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8th ed.), Pergamon Press.

Sustancialmente pura significa típicamente que la proteína está exenta de otras proteínas contaminantes derivadas del organismo fuente original. La pureza puede ser determinada por métodos estándares típicamente en peso, y ordinariamente será de por lo menos aproximadamente 40% de pureza, generalmente por lo menos aproximadamente 50% de pureza, frecuentemente por lo menos aproximadamente 60% de pureza, típicamente por lo menos aproximadamente 80% de pureza, de preferencia por lo menos aproximadamente 90% de pureza, y en realizaciones muy preferidas la pureza será de por lo menos aproximadamente 95%. Frecuentemente se añadirán vehículos o excipientes.

La solubilidad de un polipéptido o fragmento depende del entorno o ambiente del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido incluyendo la temperatura, medio o ambiente de electrolitos, características moleculares y de tamaño del polipéptido y naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a la que se usa el polipéptido varía desde aproximadamente 4°C a aproximadamente 65°C. Usualmente, la temperatura de uso es mayor que aproximadamente 18°C. Para fines de diagnóstico la temperatura será aproximadamente la temperatura ambiente o más caliente, pero menor que la temperatura de desnaturalización de los componentes en el ensayo. Para fines terapéuticos la temperatura será usualmente la temperatura corporal, típicamente alrededor de 37°C para seres humanos y ratones, aunque en ciertas situaciones la temperatura puede elevarse o disminuirse *in situ* o *in vitro*.

El tamaño y estructura del polipéptido debe ser por lo general el correspondiente a un estado sustancialmente estable y usualmente no en un estado desnaturalizado. El polipéptido puede estar asociado con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, por ejemplo, para conferir solubilidad o asociado con lípidos o detergentes de un modo que se aproxime a las interacciones de la bicapa lipídica natural.

El disolvente y los electrolitos usualmente serán un tampón fisiológicamente compatibles, de un tipo usado para la conservación de las actividades biológicas, y usualmente se aproximará a un disolvente acuoso fisiológico. Usualmente el disolvente tendrá un pH neutro de preferencia alrededor de 7,5. En algunas ocasiones se añadirá uno o más detergentes, típicamente uno no desnaturizante suave, por ejemplo CHS (hemisuccinato de colesterilo) o CHAPS (sulfonato de (3[3-(colamidopil)dimetilamonio]-1-propano), o una concentración suficientemente baja para evitar la rotura significativa de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína.

## III. Variantes físicas

Esta invención también abarca proteínas o péptidos que tienen identidad sustancial de secuencias de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de 499E9. Las variantes incluyen variantes de especies, polimórficas o alélicas.

La homología de secuencia de aminoácidos o identidad de secuencias se determina optimizando apareamientos de residuos, si es necesario introduciendo huecos según se requiera. Véase también Needleham *et al.* (1970) *J. Mol.*

*Biol.* 48:443-453; Sankoff *et al.* (1983), *Chapter One in Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Wesley, Reading, MA ; y los paquetes de programas de ordenador de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y de University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. La identidad de secuencias cambia cuando se consideran, las sustituciones conservativas como igualdades o apareamientos.

5 Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparaguina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Las secuencias homólogas de aminoácidos están típicamente destinadas a incluir variaciones polimórficas o alélicas e interespecies en cada secuencia de proteína respectiva. Las proteínas o péptidos homólogos típicos de identidad tendrán 25-100% de identidad (si pueden introducirse huecos) hasta 50-100% de identidad (si se incluyen sustituciones conservativas) con la secuencia de aminoácidos de 499E9. Las medidas de identidad serán por lo menos aproximadamente 35%, por lo general por lo menos aproximadamente 40%, frecuentemente por lo menos aproximadamente 50%, típicamente por lo menos aproximadamente 60% usualmente por lo menos aproximadamente 70%, de preferencia por lo menos aproximadamente 80% y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%.

15 El DNA aislado de 499E9 puede ser modificado fácilmente por sustituciones de nucleótidos, deleciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de nucleótidos. Estas modificaciones dan como resultado nuevas secuencias de DNA que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas que tienen similares actividades fisiológicas, inmunógenas, antigénicas u otra actividad funcional. Estas secuencias modificadas se pueden usar para producir antígenos mutantes o para aumentar la expresión. El aumento de la expresión puede implicar la amplificación de genes, el aumento de la transcripción, el aumento de la traducción y otros mecanismos. "Mutante 439E" abarca a polipéptido que de otra manera entra dentro de la definición de identidad de secuencia de la 499E9, como se definido antes, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de 499E9 como se encuentra normalmente en la naturaleza, ya sea por medio de deleción, sustitución o inserción. Esto incluye por lo general proteínas que tienen identidad significativa con una proteína que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2, y que comparte diversas actividades biológicas, por ejemplo antigénicas o inmunogénicas con dichas secuencias, y en realizaciones preferidas contiene la mayoría de las secuencias de longitud completa descritas. Las secuencias de longitud completa serán preferidas típicamente, aunque también serán de utilidad versiones truncadas, por ejemplo construcciones solubles y dominios intactos, así mismo son deseados típicamente genes o proteínas encontrados en fuentes naturales. Conceptos similares se aplican a diferentes proteínas 499E, particularmente las encontradas en diversos animales de sangre caliente, por ejemplo mamíferos y aves. Estas descripciones son generalmente significativas en abarcar todas las proteínas 499E9, y no limitadas a las realizaciones particulares de ratón específicamente analizadas.

20 La mutagénesis de 499E9 también se realiza haciendo inserciones o deleciones de aminoácidos. Pueden generarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualesquiera combinaciones para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino-terminales y carboxi-terminales. Se puede realizar mutagénesis al azar en un codón diana y los mutantes expresados pueden ser escrutados en cuanto a la actividad deseada. Los métodos para hacer mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en DNA que tiene una secuencia conocida son bien conocidos en la técnica, por ejemplo por mutagénesis del cebador M13 o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo Sambrook *et al.* (1988); Ausubel *et al.*, (1987 and Supplements); y Kunkel *et al.* (1987) *Methods in Enzymol.* 154:867-382.

25 La presente invención también proporciona proteínas recombinantes, por ejemplo proteínas de fusión heterólogas, usando segmentos de estas proteínas. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que naturalmente no están fusionadas de manera normal de la misma forma. Un concepto similar se aplica a las secuencias de ácidos nucleicos heterólogos. Las proteínas de fusión serán de utilidad como fuentes para escindir, separar y purificar porciones de las mismas.

30 Además, pueden prepararse nuevas construcciones combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, pueden "intercambiarse" segmentos de unión a dianas u otros segmentos entre diferentes polipéptidos o fragmentos. Véase, por ejemplo Cunningham *et al.* (1989) *Science* 243:1330-1336; y O'Dowd *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992.

35 El método de la fosforamidita descrito por Beaucage and Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1858-1862, producirá fragmentos de DNA sintéticos adecuados. Se obtendrá frecuentemente un fragmento bicatenario ya sea sintetizando la cadena complementaria y asociándole la cadena bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la cadena complementaria usando DNA-polimerasa con una secuencia de cebador apropiado, por ejemplo por técnicas de PCR.

#### 60 IV. Variantes funcionales

El bloqueo de la respuesta fisiológica a 499E9 puede ser el resultado de la inhibición de la unión del antígeno a su pareja de unión, por ejemplo otro de ella misma, probablemente a través de inhibición competitiva. Así, ensayos *in vitro* de la presente invención, frecuentemente usarán proteínas aisladas, membranas procedentes de células que expresan una 499E9 recombinante asociada a membrana, fragmentos solubles que comprenden segmentos de unión al antígeno de estas proteínas, o fragmentos unidos a sustratos en fase sólida. Estos ensayos también podrá permitir la determinación diagnóstica de los efectos de cualesquiera mutaciones y modificaciones de segmento, o mutaciones y modificaciones de antígenos, por ejemplo análogos de 499E9.

## ES 2 305 009 T3

Esta invención también contempla el uso de ensayos competitivos de escrutinio de fármacos, por ejemplo, en donde anticuerpos neutralizantes para el antígeno o fragmentos de unión compiten con un compuesto de ensayo para unirse a la proteína, por ejemplo una secuencia de proteína natural.

5 “Derivados” de antígenos de 499E9 incluyen mutantes de secuencia de aminoácidos procedentes de formas que se presentan de modo natural, variantes de glicosilación y conjugados covalentes y agregados con otros restos químicos. Se pueden preparar derivados covalentes por enlace de funcionalidades a grupos que se encuentran en cadenas laterales de aminoácidos de 499E9 o en los extremos N ó C, por ejemplo, por métodos estándares. Véase por ejemplo, Lundblad and Noyes (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification*, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli  
10 (ed.) (1989) *Techniques in Protein Chemistry*, Academic Press, San Diego, CA; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, FL.

En particular, están incluidas las alteraciones por glicosilación, por ejemplo las realizadas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento; o en etapas posteriores del proceso. Véase por  
15 ejemplo Elbein (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:497-534. También se incluyen versiones de los péptidos con la misma secuencia primaria de aminoácidos que tiene otras modificaciones secundarias que incluyen, residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre 499E9 y otras proteínas homólogas o heterólogas. Muchos  
20 receptores de citoquinas u otras proteínas de superficie son multímeros, por ejemplo entidades homodímeras, y una construcción repetitiva puede tener diversas ventajas, incluyendo susceptibilidad reducida a la escisión proteolítica. Los ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido informador, por ejemplo luciferasa, con un segmento o dominio de una proteína, por ejemplo un segmento de unión a un receptor, de tal manera que pueda ser determinada fácilmente la presencia o localización del ligando fusionado. Véase por ejemplo, Dull *et al.*, patente de EE.UU. N° 4.859.609.  
25 Otras parejas de unión de genes incluyen: beta-galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A, beta-lactamasa, alfa-amilasa, alcohol-deshidrogenasa, factor alfa de apareamiento de levadura, y colas de detección o purificación, tales como una secuencia FLAG de secuencia His6. Véase. por ejemplo, Godowski, *et al.* (1988) *Science* 241:312-816.

Los péptidos de fusión típicamente se prepararán por cualesquiera métodos de ácidos nucleicos recombinantes o  
30 por métodos de polipéptidos sintéticos. Las técnicas para manipulación y expresión de ácidos nucleicos se describen en general por ejemplo en Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; y Ausubel *et al.* (eds) (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, NY. Las técnicas para la síntesis de polipéptidos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232: 341-347; Atherton *et al.* (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Grant (1992) *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman,  
35 NY.

Esta invención también contempla el uso de otros derivados de 499E9 distintos de las variaciones en la secuencia de aminoácidos o glicosilación. Dichos derivados pueden implicar asociación covalente o agregativa con restos químicos. Los derivados covalentes o agregativos serán útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos o en  
40 métodos de purificación, tales como purificación por afinidad de parejas de unión, por ejemplo otros antígenos. Una 499E9 puede ser inmovilizada por unión covalente a un soporte sólido, tal como SEPHAROSE activada por bromuro de cianógeno, por métodos que son bien conocidos en la técnica, o puede ser adsorbida sobre superficies de poliolefinas, con o sin reticulación con glutaraldehído, para uso en el ensayo o purificación de anticuerpos anti-499E9 o una composición de unión alternativa. Las 499E9 también pueden ser marcadas con un grupo detectable, por ejemplo para  
45 uso en ensayos de diagnóstico. La purificación de 499E9 puede ser efectuada por un anticuerpo inmovilizado o una pareja de unión complementaria.

Una 499E9 o fragmento solubilizado de esta invención puede ser usado como inmunógeno para la producción  
50 de antisuero o anticuerpos específicos para unirse al antígeno o sus fragmentos. El antígeno purificado puede ser usado para escrutar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígenos, abarcando fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, etc. La 499E9 purificada también se puede usar como un reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados del antígeno o fragmentos celulares que contengan el antígeno, ambos de los cuales pueden ser el diagnóstico de una de un estado  
55 morbo anormal o fisiológico específico o enfermedad. Esta invención contempla anticuerpos producidos contra secuencias de aminoácidos codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o fragmentos de de proteínas que las contienen. En particular, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión para, o que se producen contra fragmentos específicos que se predice que están fuera de la bicapa lipídica, ambos extracelulares o intracelulares.

60 La presente invención contempla el aislamiento de variantes de especies adicionales estrechamente relacionadas. Las técnicas de análisis de transferencia de Southern y Northern deben establecer que entidades genéticas similares existen en otros mamíferos. Es probable que las 499E9 estén extendidas ampliamente en variantes de especies, por ejemplos roedores, laqomorfos, carnívoros, artiodáctilos, perisodáctilos y primates.

65 La invención también proporciona medios para aislar un grupo de antígenos relacionados que exhiben tanto características distintas como similares en estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las moléculas será desarrollada en gran medida mediante el aislamiento y caracterización de variantes

de especies distintas adicionales de los mismos. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

Los genes aislados permitirán la transformación de células que carecen de la expresión de una 499E9 correspondiente, por ejemplo cualesquiera tipos de especie o células que carezcan de antígenos correspondientes y exhiban actividad de fondo negativa. Esto debe permitir el análisis de la función de 499E9 en comparación con células de control no transformadas.

Es posible la disección de elementos estructurales críticos que afectan a las diversas funciones de activación y diferenciación mediadas a través de estos antígenos, utilizando técnicas estándares de biología molecular moderna, particularmente en comparar miembros de la clase relacionada. Véase, por ejemplo, la técnica de de mutagénesis por exploración de homólogos descrita en Cunningham *et al.* (1989) *Science* 243:1339-1336; y los enfoques usados en O'Dowd *et al.*, (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechleiter *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:4381-4380.

Las funciones intracelulares implicarían probablemente segmentos del antígeno que normalmente son accesibles al citosol. Sin embargo, puede ocurrir internalización de proteínas bajo ciertas circunstancias e interacción entre componentes intracelulares y segmentos "extracelulares". Los segmentos específicos de interacción de 499E9 con otros componentes intracelulares, pueden ser identificados por mutagénesis o métodos bioquímicos directos, por ejemplo métodos de reticulación o de afinidad. También será aplicable el análisis estructural por análisis cristalográfico u otros métodos físicos. La investigación adicional del mecanismo de la transducción de señales incluirá el estudio de componentes asociados que pueden ser aislables por métodos de afinidad o por medios genéticos, por ejemplo, análisis de complementación de mutantes.

Se continuará el estudio adicional de la expresión y control de 499E9. Los elementos de control asociados con los antígenos deben exhibir diferenciales patrones fisiológicos, de desarrollo, específicos de tejidos u otros patrones de expresión. Son de interés las regiones genéticas hacia el extremo 3' o hacia el extremo 5', por ejemplo elementos de control. En particular, se han encontrado variantes fisiológicas o de desarrollo, por ejemplo, formas múltiples alternativamente procesadas del antígeno. Véase, por ejemplo, la SEQ ID NO:1. Así, el corte y empalme diferencial del mensaje puede conducir a una clasificación de formas unidas a membranas, formas solubles y versiones modificadas del antígeno.

Estudios estructurales de los antígenos conducirán al diseño de nuevos antígenos, particularmente análogos que exhiban propiedades agonistas o antagonistas sobre la molécula. Esto se puede combinar con los métodos de escrutinio previamente descritos para aislar antígenos que exhiben un espectro deseado de actividades.

#### V. Anticuerpos

Se pueden producir anticuerpos contra diversas 499E9, incluyendo variantes de especies polimorfas o variantes alélicas y sus fragmentos, tanto en sus formas de presentación natural como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, se pueden producir anticuerpos para 499E9 en cualquiera de sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones naturales o desnaturalizadas. También se contemplan anticuerpos-anti-idiotípicos.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones monocatenarias, contra fragmentos predeterminados de los antígenos, se pueden producir por inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunógenas. Se preparan anticuerpos monoclonales a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos se pueden escrutar para unirse a 499E9 normales o defectuosas, o se pueden seleccionar en cuanto a actividad agonista o antagonista, por ejemplo mediada a través del antígeno o su pareja de unión. Los anticuerpos pueden ser agonistas o antagonistas, por ejemplo, por unión de ligandos estéricamente bloqueados. Estos anticuerpos monoclonales se unirán por lo menos con una  $K_D$  de aproximadamente 1 mM, usualmente por lo menos aproximadamente 300  $\mu$ M, típicamente por lo menos aproximadamente 100  $\mu$ M, más típicamente por lo menos aproximadamente 30  $\mu$ M de preferencia aproximadamente 10  $\mu$ M, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 3  $\mu$ M o inferior.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes pueden escrutarse por su capacidad de unión a los antígenos sin inhibir la unión a su pareja de unión. Como anticuerpos neutralizantes pueden ser útiles en ensayos de unión no competitivos. También serán de utilidad en la detección o cuantificación de proteínas 499E9 o sus parejas de unión. Véase por ejemplo Chan (ed.) (1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FL; Price and Newman (eds.) (1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N. Y.; y Ngo (ed.) (1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y.. Las absorciones cruzadas u otros ensayos identificarán anticuerpos que exhiben diversos espectros de especificidades, por ejemplo especificidades únicas o compartidas con especies.

Además, los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión al antígeno de esta invención pueden ser potentes antagonistas que se unen al antígeno e inhiben la unión funcional o inhiben la capacidad de una pareja de unión de producir una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y pueden ser acoplados a toxinas o radionúclidos de modo que cuando el anticuerpo se une al antígeno, se mata una célula que lo expresa, por ejemplo, en su superficie. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse con fármacos u otros agentes terapéuticos, bien directamente o bien indirectamente por medio de un fragmento enlazador, y pueden efectuar el envío del fármaco a su diana.

Los fragmentos del antígeno pueden unirse a otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o unidos covalentemente para ser usados como inmunógenos. Un antígeno y sus fragmentos pueden ser fusionados o unidos covalentemente a una variedad de inmunógenos, tales como hemocianina de lapa bocallave, seroalbúmina bovina, toxoide del tétano, etc. Véase *Microbiology*, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Lansteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, New York; Williams, *et al.* (1967) *Methods in Immunology and ImmunoChemistry* vol. 1, Academic Press, New York; y Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, N.Y. para descripciones de métodos de preparar antisueros policlonales.

En algunos casos es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de varios hospedantes mamíferos tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. Una descripción de las técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales puede encontrarse, por ejemplo, en Stites *et al.*, (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en dicho texto; Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1988) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed.), Academic Press, New York.; y particularmente en Kohler and Milstein (1975) en *Nature* 256:495-497. que describen el método de generar anticuerpos monoclonales.

Otras técnicas adecuadas incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativamente a la selección de colecciones de anticuerpos en vectores fagos o similares. Véase, Huse, *et al.* (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda". *Science* 248:1275-1281 y Ward, *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y los anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y los anticuerpos estarán marcados por unión, covalente o no covalente, a una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se describen extensamente en la literatura tanto científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, co-factores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE.UU. N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. También se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, patente de EE.UU. N° 4.816.567; Moore *et al.*, patente de EE.UU. N° 4.642.334; y Queen, *et al.*, (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.* 86:10029-10033.

Los anticuerpos de esta invención también se pueden usar por cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Se pueden preparar columnas en las cuales los anticuerpos se unen a un soporte sólido. Véase por ejemplo Wilchek *et al.* (1984) *Meth. Enzymol.* 104:3-55.

Los anticuerpos producidos contra cada 499E9 también serán de utilidad para producir anticuerpos anti-idiotípicos. Esto será de utilidad en la detección o diagnóstico de diversos estados inmunológicos relacionados con la expresión de los antígenos respectivos.

## VI. Ácidos nucleicos

Las secuencias peptídicas descritas y los reactivos relacionados son de utilidad en la detección, aislamiento o identificación de un clon de DNA que codifica 499E9, por ejemplo de una fuente natural. Típicamente serán de utilidad en el aislamiento de un gen de mamífero, y procedimientos similares se aplicarán para aislar genes de otras especies, por ejemplo animales de sangre caliente, tales como aves y mamíferos. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento de 499E9 de otras especies. Deben estar disponibles varios enfoques diferentes para aislar con éxito un clon de ácido nucleico adecuado.

La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos por métodos estándares, como se ha descrito anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada pueden ser presenta a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Alternativamente, la 499E9 puede usarse como un reactivo de unión específica, y puede aprovecharse su especificidad de unión, de un modo muy similar a como se usaría un anticuerpo.

Por ejemplo, la composición de unión específica podría usarse para escrutar una genoteca de expresión hecha de una línea celular que expresa una 499E9. El escrutinio puede ser tinción estándar del antígeno expresado en superficie o por el método de adherencia sobre plástico (*panning*). El escrutinio de la expresión intracelular puede realizarse también por medio de varios procedimientos de tinción o de inmunofluorescencia. Las composiciones de unión podrían usarse para purificar por afinidad o clasificar células que expresan la proteína.

Los segmentos peptídicos también se pueden usar para predecir oligonucleótidos apropiados para escrutar una genoteca. El código genético se puede usar para seleccionar oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para escrutinio. Véase la, SEQ ID NO:1. En combinación con técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos podrían ser útiles en seleccionar clones correctos a partir de una genoteca. Las secuencias complementarias también serán usadas como sondas, cebadores o cadenas antisentido. En base a la identificación del probable dominio extracelular, diversos fragmentos deben ser particularmente útiles, por ejemplo, acoplados con técnicas de vector anclado o PCR de poli-A complementario o con DNA complementario de otros péptidos.

Esta invención contempla el uso de DNA aislado o fragmentos que codifican un polipéptido 499E9 correspondiente biológicamente activo. Además esta invención cubre un DNA aislado o recombinante que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activo que es capaz de hibridarse bajo condiciones apropiadas con las secuencias de DNA descritas en la presente memoria. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser un antígeno intacto o fragmento, y tiene una secuencia de aminoácidos que se describe por ejemplo en la SEQ ID NO:1. Además, esta invención cubre el uso de DNA aislado o recombinante, o sus fragmentos, que codifican proteínas que son homólogas a 499E9 o que se aisló usando cDNA que codifica una 499E9 como sonda. El DNA aislado puede tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de poli-adición y otros.

El ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo un RNA, DNA, o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otros componentes que acompañan de modo natural a una secuencia natural, por ejemplo ribosomas, polimerasas, y/o secuencias genómicas flanqueantes a partir de las especies de las que se originan. El término abarca una secuencia de ácido nucleico que ha sido separada de su medio ambiente natural, e incluye aislados de DNA recombinantes o clonados y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. En general, el ácido nucleico estará en un vector o fragmento de menos de aproximadamente 50 kb, normalmente menos de aproximadamente 30 kb, típicamente menos de aproximadamente 10 kb, y preferiblemente menos de aproximadamente 6 kb.

Un ácido nucleico aislado será generalmente una composición homogénea de moléculas, pero, en algunas realizaciones contendrá una heterogeneidad menor. Esta heterogeneidad se encuentra típicamente en los extremos del polímero o porciones no críticas para una función o actividad biológica deseada.

Un ácido nucleico "recombinante" se define por su método de producción o por su estructura. Con referencia a su método de producción, por ejemplo, un producto hecho por un proceso, siendo el proceso el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo las que implican la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente la selección o producción. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico hecho generando una secuencia que comprende una fusión de dos fragmentos que no son naturalmente contiguos uno respecto al otro, sino que significa excluir productos de la naturaleza, por ejemplo, mutantes que se presentan de modo natural. Así, por ejemplo, están abarcados los productos preparados transformando células con cualquier vector que no se presente naturalmente, como son los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia derivada usando cualquier proceso de oligonucleótidos sintéticos. Eso se hace frecuentemente para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservador, introduciendo o eliminando típicamente al mismo tiempo un sitio de reconocimiento de secuencia.

Alternativamente, esto se lleva a cabo para unir segmentos de ácidos nucleicos de funciones deseadas para generar una sola entidad genética que comprende una combinación deseada de funciones no encontradas en las formas naturales disponibles comúnmente. Los sitios de reconocimiento por enzimas de restricción son frecuentemente la diana de dichas manipulaciones artificiales, pero por diseño pueden ser incorporados otros sitios dianas específicos, por ejemplo promotores, sitios de replicación de DNA, secuencias de regulación, secuencias de control u otras características útiles. Un concepto similar se pretende para un recombinante, por ejemplo, un polipéptido de fusión. Están específicamente incluidos los ácidos nucleicos sintéticos, que debido a la redundancia del código genético codifican polipéptidos similares a los fragmentos de estos antígenos, y fusiones de secuencias de diversas variantes de especies diferentes.

Un "fragmento" significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente por lo menos aproximadamente 22 nucleótidos ordinariamente por lo menos aproximadamente 29 nucleótidos, más frecuentemente por lo menos aproximadamente 35 nucleótidos, típicamente por lo menos aproximadamente 41 nucleótidos, normalmente por lo menos aproximadamente 47 nucleótidos, preferiblemente por lo menos aproximadamente 55 nucleótidos y en las realizaciones particularmente preferidas será por lo menos aproximadamente 60 o más nucleótidos.

Un DNA que codifica una proteína 499E9 será particularmente útil para identificar genes, mRNA y especies de cDNA que codifiquen proteínas relacionadas u homólogas, así como diversos DNA que codifiquen proteínas homólogas de especies diferentes. Hay probablemente homólogos en otras especies, incluyendo primates, roedores y aves. Diversas proteínas 499E9 deben de ser homólogas y están abarcadas en la presente invención. Sin embargo, incluso los genes que codifican proteínas que tienen una relación evolutiva más distante al antígeno pueden aislarse fácilmente bajo condiciones apropiadas usando estas secuencias si son lo suficientemente homólogos. Las proteínas 499E9 de primate son de particular interés.

Los clones recombinantes derivados de las secuencias genómicas, por ejemplo, que contienen intrones, serán útiles para estudios transgénicos, incluyendo, por ejemplo, células y organismos transgénicos, y para terapia de genes. Véase, por ejemplo Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, San Diego, pp. 1502-1504; Travis (1992) *Science* 256:1392-1394; Kuhn *et al.*, (1991) *Science* 254:707-710; Capecchi (1989) *Science* 244:1288; Robertson (1987) (ed.) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology*, 10:180-199.

La homología sustancial en el contexto de comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que los segmentos o sus cadenas complementarias, cuando se comparan, son idénticos cuando están óptimamente alineados, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en por lo menos aproximadamente 50% de los nucleótidos, generalmente por lo menos aproximadamente 58%, ordinariamente por lo menos aproximadamente 65%, frecuentemente por lo menos aproximadamente 71%, típicamente por lo menos aproximadamente 77%, usualmente por lo menos aproximadamente 85%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 95 a 98% o más, y en realizaciones particulares, tanto como aproximadamente 99% o más de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibridarán bajo condiciones de hibridación selectiva, a una cadena, o su complemento, usando típicamente una secuencia de 499E9, por ejemplo, en la SEQ ID NO: 1. Típicamente, la hibridación selectiva ocurrirá cuando haya por lo menos aproximadamente 55% de homología en un tramo de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos, preferiblemente por lo menos aproximadamente 75% en un tramo de aproximadamente 25 nucleótidos y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 90% en un tramo de aproximadamente 20 nucleótidos. Véase, Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de la comparación de homología, según se describe, puede ser sobre tramos más largos, y en ciertas realizaciones será sobre un tramo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, usualmente por lo menos aproximadamente 28 nucleótidos, típicamente por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos y preferiblemente por menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos.

Las condiciones rigurosas, en referencia a la homología en el contexto de hibridación, serán condiciones combinadas rigurosas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente los controlados en las reacciones de hibridación. Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de más de aproximadamente 30°C, usualmente de más de aproximadamente 37°C, típicamente más de aproximadamente 55°C, preferiblemente más de aproximadamente 70°C. Las condiciones de sal rigurosas ordinariamente serán de menos de aproximadamente 1000 mM, usualmente menos de aproximadamente 400 mM, típicamente menos de aproximadamente 250 mM, preferiblemente menos de aproximadamente 150 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de cualquier parámetro individual. Véase, por ejemplo, Wetmur and Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370. 499E9 de otras especies de mamíferos puede ser clonada y aislada mediante hibridación de especies cruzadas de especies estrechamente relacionadas. La homología puede ser relativamente baja entre especies distantemente relacionadas, y por lo tanto es aconsejable la hibridación de especies relacionadas en forma relativamente estrecha. Alternativamente, la elaboración de una preparación de anticuerpos que exhiba menos especificidad de especie puede ser útil en enfoques de clonación con expresión.

#### VII. Preparación de 499E9; Miméticos

El DNA que codifica 499E9 o sus fragmentos puede obtenerse mediante síntesis química, escrutando genotecas de cDNA, o escrutando genotecas genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas de células o muestras de tejidos. Véase, por ejemplo, Okayama and Berg (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170; Gubler and Hoffman (1983) *Gene* 25:263-269; y Glover (ed.) (1984) *DNA Cloning: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford. Alternativamente, las secuencias proporcionadas en la presente invención proporcionan cebadores de PCR útiles o permiten la preparación sintética u otra preparación de genes adecuados que codifican 499E9; incluyendo las realizaciones que se presentan de modo natural.

Este DNA puede ser expresado en una amplia variedad de células hospedantes para la síntesis de una 499E9 de longitud completa o fragmentos que puedan a su vez, usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de unión; para la construcción y expresión de moléculas modificadas y para estudios de estructura/función.

Los vectores, según se usan en la presente memoria, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de DNA integrables y otros vehículos que hagan posible la integración de fragmentos de DNA en el genoma del hospedante. Véase, por ejemplo, Pouwels *et al.* (1985 and Supplements) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y.; y Rodríguez *et al.* (1988) (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

Para los propósitos de esta invención, las secuencias de DNA están enlazadas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el DNA para una pre-secuencia o secuencia delantera secretora está enlazado operativamente a un polipéptido si éste es expresado como una pre-proteína o participa en dirigir el polipéptido a la membrana celular o en la secreción del polipéptido. Un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificadora si éste controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión de ribosoma esta enlazado operativamente a una secuencia codificadora si está colocado para permitir la traducción. Usualmente, enlazado operativamente significa contiguo y en marco de lectura, sin embargo, ciertos elementos genéticos, tales como genes represores no están enlazados contiguamente, sino todavía unidos a secuencias operadoras que a su vez controlan la expresión. Véase, por ejemplo, Rodríguez *et al.*, Chapter 10, pp. 205-236; Balbas and Bolivar (1990) *Methods in Enzymology* 185:14-37 y Ausubel *et al.* (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, NY.

Ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama *et al.* (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMC1neo Poli-A, Véase Thomas *et al.* (1987). *Cell* 51:503-512 y un vector de baculovirus, tal como pAC 373 o pAC 610. Véase, por ejemplo, Miller (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.

Frecuentemente se deseará expresar un polipéptido de 499E9, en un sistema que proporcione un patrón de glicosilación específico o definido. Véase, por ejemplo, Luckew and Summers (1988) *Bio/Technology* 6:47-55 y Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:487-511.

5 La 499E9, o uno de sus fragmentos, puede ser manipulada para ser fosfatidil-inositol (PI) enlazado a una membrana celular, pero puede ser eliminada de las membranas mediante tratamiento con una enzima de escisión de fosfatidil-inositol, por ejemplo, fosfatidil-inositol-fosfolipasa-C. Esta libera el antígeno en una forma biológicamente activa, y permite la purificación mediante procedimientos normales de química de proteínas. Véase, por ejemplo, Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 988:427-454; Tse *et al.*, (1985) *Science* 230:1003-1008 y Brunner *et al.*, (1991) *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.

Ahora que la 499E9 ha sido caracterizada, sus fragmentos o derivados pueden ser preparados mediante procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Estos incluyen procedimientos, tales como los descritos en Stewart and Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky and Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, New York; y Villafranca (ed.) (1991) *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, CA.

### VIII. Usos

20 La presente invención proporciona reactivos que encontrarán uso en aplicaciones de diagnóstico como las descritas en muchas partes de la presente memoria, por ejemplo, en la descripción general para condiciones mediadas por células T, o más adelante en la descripción de kits para diagnóstico.

25 Esta invención proporciona también reactivos con valor terapéutico significativo. La 499E9 (natural o recombinante), sus fragmentos y anticuerpos para los mismos, junto con compuestos identificados que tienen afinidad de unión a 499E9, deben de ser útiles en el tratamiento de estados asociados con fisiología o desarrollo anormales, incluyendo la proliferación anormal, por ejemplo, estados cancerosos o estados degenerativos. En particular, la modulación del desarrollo de células linfoides se conseguirá mediante tratamiento terapéutico adecuado usando las composiciones proporcionadas por la presente invención. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con la expresión anormal o señalización anormal por una 499E9 debe de ser una diana para una agonista o antagonista del antígeno. El antígeno desempeña una función en la regulación o el desarrollo de células hematopoyéticas, por ejemplo, células linfoides, que afectan a las respuestas inmunológicas, por ejemplo, las trastornos autoinmunes.

35 En particular, el antígeno proporcionará una señal co-estimuladora para la activación celular. De esta manera, la 499E9 modulará probablemente las interacciones mediadas por células T con otros tipos de células, por ejemplo, células que posean un receptor para la misma. Estas interacciones conducirían, en contextos particulares, a la modulación del crecimiento de la célula, a la síntesis de citoquinas por esas u otras células o al desarrollo de células efectoras particulares.

40 Además, la 499E9 o sus antagonistas podrían redirigir las respuestas de las células, por ejemplo, entre la polarización de Th1 y Th2, o con células Th0. Entre estos agonistas deben de estar varios anticuerpos que reconozcan los epítomos adecuados, por ejemplo, que simulen la unión de 499E9 a su receptor. Alternativamente, se pueden unir a epítomos que pueden bloquear estéricamente la unión al receptor.

45 También pueden ser útiles los antagonistas de 499E9, tales como la forma secretada que se presenta naturalmente de 499E9 o anticuerpos de bloqueo. Estos antagonistas pueden proporcionar una vía selectiva y poderosa para modular respuestas inmunes en situaciones anormales, por ejemplo, trastornos autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune de Hashimoto, así como respuestas inflamatorias agudas y crónicas en las cuales la activación y expansión de las células T y/o la memoria de las células T inmunológicas jueguen un papel importante. Véase también Samter *et al.*, (eds) *Immunological Diseases* vols. 1 y 2, Little, Brown and Co. Se puede llevar a cabo la regulación de la activación y expansión de las células T y/o la liberación de citoquinas por la forma secretada que se presenta naturalmente de 499E9, o uno de sus antagonistas.

55 Además, podrían ser útiles ciertas composiciones en combinación con otros moduladores de señalización de células T. Esas otras moléculas de señalización incluyen los reactivos de TcR, CD40, CD40L, CTLA-8, CD28, SLAM, FAS y sus antagonistas respectivos.

60 Se conocen varios estados anormales en cada uno de los tipos de células que muestran poseer mRNA de 499E9 mediante análisis por transferencia Northern. Véase Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. Merck & Co., Rahway, N.J.; Thom *et al.*, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, N.Y. y Weatherall *et al.*, (eds.) *Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford. Muchos otros estados y enfermedades médicos implican las células T o son mediados por células T, y muchas de estos serán sensibles al tratamiento por un agonista o antagonista proporcionado en la presente invención. Véase, por ejemplo, Stites and Terr (eds; 1991) *Basic and Clinical Immunology*, Appleton and Lange, Nowalk, Connecticut y Samter *et al.*, (eds) *Immunological Diseases*, Little, Brown and Co. Estos problemas deben ser susceptibles de prevención o tratamiento usando las composiciones proporcionadas en la presente invención.



## ES 2 305 009 T3

Los anticuerpos de 499E9 pueden ser purificados y después administrados a un paciente, veterinario o humano. Estos reactivos pueden ser combinados para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables convencionales, por ejemplo, adyuvantes inmunógenos, junto con estabilizadores, excipientes o conservantes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden ser filtradas de modo estéril y colocadas en formas de dosificación, tal como mediante liofilización en viales de dosificación o conservadas en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención contempla también el uso de anticuerpos o sus fragmentos de unión, incluyendo formas que no sean de unión de complemento.

El escrutinio de fármacos usando 499E9 o sus fragmentos puede llevarse a cabo para identificar compuestos que tengan afinidad de unión a 499E9, u otros efectos biológicos relevantes en funciones de 499E9, incluyendo el aislamiento de componentes asociados. Después se pueden utilizar ensayos biológicos subsiguientes para determinar si el compuesto tiene actividad estimulante intrínseca o si es un bloqueador o antagonista porque bloquee la actividad del antígeno, por ejemplo, antagonistas de mutéina. Asimismo, un compuesto que tenga actividad estimulante intrínseca puede activar la vía de la señal y es de esta manera una agonista porque estimula la actividad de 499E9. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos, de bloqueo para 499E9 como antagonistas y de moléculas estimuladoras, por ejemplo, mutéinas, como agonistas. Este enfoque debe ser particularmente útil con otras variantes de especies de 499E9.

Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. De esta manera, las dosis de tratamiento deberán ser valoradas, para optimizar la seguridad y eficacia. Típicamente las dosis usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para la administración *in situ* de estos reactivos. Los ensayos en animales de dosis eficaces para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán una indicación predictiva adicional de la dosis para seres humanos. Se describen varias consideraciones, por ejemplo, en Gilman *et al.*, (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Los métodos para la administración se describen en dichos textos y más adelante, por ejemplo, para la administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica y otros. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, tampones y otros compuestos descritos, por ejemplo, en *The Merck Index*, Merck & Co., Rahway, New Jersey. Ordinariamente se espera que los intervalos de dosificación estén en cantidades inferiores a concentraciones de 1 mM, típicamente, concentraciones de menos de aproximadamente 10  $\mu$ M, usualmente menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 pM (picomolar) y más preferiblemente menos de aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo adecuado. Las formulaciones de liberación prolongada o un aparato de liberación prolongada, se utilizarán normalmente para la administración continua o a largo plazo. Véase, por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533.

La 499E9, sus fragmentos y anticuerpos para los mismos o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, pueden administrarse directamente al hospedante que será tratado o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugarlos a proteínas portadoras, tales como ovoalbúmina seroalbúmina, antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse en muchas formulaciones de dosis convencional. Aunque es posible que el ingrediente activo sea administrado solo, se prefiere presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden típicamente por lo menos un ingrediente activo como el definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables para el mismo. Cada vehículo debe ser tanto farmacéutica como fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes y no debe ser perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos conocidos en la técnica farmacéutica. Véase por ejemplo, Gilman *et al.*, (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; and Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis *et al.*, (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, New York; Lieberman *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, New York. La terapia de esta invención puede combinarse con, o usarse en asociación con, otros agentes, por ejemplo otros moduladores de la activación de las células T, por ejemplo CD40, ligandos de CD40, CD28, CTLA-4, B7, B70, SLAN, entidades señalizadoras de células T o sus respectivos antagonistas.

Tanto las formas que existen en la naturaleza como las recombinantes de las 499E9 de esta invención son particularmente útiles en kits y métodos de ensayo que son capaces de escrutar compuestos en cuanto a la actividad de unión a las proteínas. Se han desarrollado diversos métodos de ensayo automáticos, para permitir el escrutinio de cientos de miles de compuestos en un corto periodo. Véase, por ejemplo, Fodor *et al.*, (1991) *Science* 251:767-773, que describe medios para analizar la afinidad de unión mediante una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados puede ser ampliamente facilitado mediante la disponibilidad de grandes cantidades de 499E9 soluble y purificada como la proporcionada por esta invención.

Se pueden usar otros métodos para determinar los residuos críticos en las interacciones 499E9-receptor de 499E9. Se puede realizar el análisis mutacional, por ejemplo, véase Somoza *et al.*, (1993) *J. Exptl. Med.* 178:549-558, para determinar residuos específicos críticos en la interacción y/o señalización. Tanto los dominios extracelulares, implicados en la interacción homofílica como el dominio intracelular, que proporciona interacciones son importantes en la señalización intracelular.

Por ejemplo, se pueden encontrar normalmente antagonistas una vez que el antígeno ha sido definido estructuralmente, por ejemplo, mediante datos de la estructura terciaria. El análisis de análogos potenciales de interacción es ahora posible gracias al desarrollo métodos de ensayo altamente automatizados usando 499E9 purificada. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas usando técnicas de escrutinio descritas en la presente memoria. De particular importancia son los compuestos que se ha encontrado tienen una afinidad de unión combinada para un espectro de moléculas de 499E9, por ejemplo, compuestos que pueden servir como antagonistas para variantes de especie de 499E9.

Un método para el escrutinio de fármacos utiliza células hospedantes eucariotas o procariotas que son transformadas establemente con moléculas de DNA recombinante que expresan un 499E9. Se pueden aislar células que expresan un 499E9 en el aislamiento de otras moléculas. Dichas células, ya sea en forma viable o fija, pueden usarse para ensayos estándares de unión de pareja de unión. Véase también, Farce *et al.*, (1989) *Science* 246:243-247 y Owicki *et al.*, (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:4007-4011, que describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares.

Otra técnica para escrutinio de fármacos incluye un enfoque que proporciona escrutinio de alta producción para compuestos que tengan afinidad de unión adecuada a una 499E9 y se describe en detalle en Geysen, Solicitud de patente internacional WO84/03564 publicada el 13 de septiembre de 1984. Primero, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de ensayo constituidos por pequeños péptidos diferentes sobre un sustrato sólido, por ejemplo, pequeñas varillas de plástico o alguna otra superficie adecuada, véase Fodor *et al.* (1991). Después todas, las varillas son hechas reaccionar con 499E9 solubilizado, purificado, no purificado o solubilizado, y lavadas. La siguiente etapa incluye detectar 499E9 unida.

El diseño racional de fármacos también puede basarse en estudios estructurales de las formas moleculares de la 499E9 y otros efectores o análogos. Los efectores pueden ser otras proteínas que medien otras funciones en respuesta a la unión, u otras proteínas que interactúen normalmente con 499E9. Un medio para determinar que sitios interactúan con otras proteínas específicas es una determinación de la estructura física, por ejemplo, cristalografía de rayos X, técnicas de RMN bidimensional. Estas proporcionarán una guía en cuanto a cuales residuos de aminoácidos forman regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase, por ejemplo, Blundell and Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, New York.

#### IX. Kits

Esta invención contempla también el uso de proteínas 499E9, sus fragmentos, péptidos y sus productos de fusión en una variedad de kits y métodos de diagnóstico para detectar la presencia de otra 499E9 o pareja de unión. Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contiene un péptido o segmento de gen definido de 499E9 o un reactivo que reconozca al uno o al otro, por ejemplo, fragmentos o anticuerpos de 499E9.

Un kit para determinar la afinidad de unión de un compuesto de ensayo a una 499E9 comprenderá típicamente un compuesto de ensayo; un compuesto marcado, por ejemplo una pareja de unión o anticuerpo que tenga afinidad de unión conocida para 499E9; una fuente de 499E9 (que se presente naturalmente o recombinante); y un medio para separar los compuestos marcados unidos de los libres, tal como una fase sólida para inmovilizar la molécula. Una vez que los compuestos sean escrutados, aquellos que tengan afinidad de unión adecuada al antígeno pueden ser evaluados en ensayos biológicos adecuados, como los muy conocidos en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o antagonistas para la vía de señalización de 499E9. La disponibilidad de polipéptidos de 499E9 recombinantes también proporciona patrones bien definidos para calibrar dichos ensayos.

Un kit preferido para determinar la concentración de, por ejemplo, una 499E9 en una muestra comprenderá típicamente un compuesto marcado, por ejemplo, una pareja de unión o anticuerpo que tiene una afinidad de unión conocida para el antígeno, una fuente de antígeno (que se presenta de modo natural o recombinante) y medios para separar el compuesto unido del compuesto marcado libre, por ejemplo una fase sólida para inmovilizar la 499E9. Se proporcionarán normalmente compartimentos que contienen reactivos e instrucciones.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión al antígeno, específicos para 499E9 son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de 499E9 y/o sus fragmentos. Dichos ensayos de diagnóstico pueden emplear lisados, células vivas, células fijas, inmunofluorescencia, cultivos de células, fluidos corporales y además pueden la detección de antígenos relacionados con el antígeno del suero o similares. Los ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos sin una etapa de separación entre el complejo del reactivo libre y la pareja de unión al antígeno o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen varios ensayos comerciales, tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo con inmuno-adsorbente unido a enzima (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), técnica de inmunoensayo multiplicado con enzima (EMIT), inmunoensayo fluorescente con sustrato marcado (SLFIA) y similares, Véanse, por ejemplo, Van Vunakis, *et al.* (1980) *Meth Enzymol.* 70:1-525; Harlow and Lane (1980) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY y Coligan *et al.* (eds.) (1993) *Current Protocols in Immunology*, Greene and Wiley, NY.

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener un uso similar para diagnosticar la presencia de anticuerpos contra una 499E9, ya que pueden ser el diagnóstico de varios estados anormales. Por ejemplo, la sobreproducción de

499E9 puede dar como resultado la producción de varias reacciones inmunológicas que pueden ser el diagnóstico de estados fisiológicos anormales, particularmente en estados de células proliferativas, tales como cáncer o activación o diferenciación anormales.

5 Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se proporcionan en kits, para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la presente invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, del protocolo y del marcador, se proporciona un anticuerpo o pareja de unión marcado o no marcado, o 499E9 marcada. Dicho anticuerpo está normalmente junto con otros aditivos, tales como tampones, estabilizadores, materiales necesarios para la producción de señales, tales como sustratos para enzimas y similares. Preferiblemente, el kit contendrá también instrucciones para el  
10 use adecuado y desecho de los contenidos después del uso. Típicamente, el kit tiene compartimentos para cada reactivo útil. Deseablemente, los reactivos se proporcionan en forma de un polvo liofilizado seco, en donde los reactivos pueden ser reconstituidos en un medio acuoso proporcionando concentraciones adecuadas de reactivos para llevar a cabo el ensayo.

15 Muchos de los constituyentes anteriormente mencionados del escrutinio de fármacos y de los ensayos de diagnóstico pueden usarse sin modificación o pueden modificarse de una variedad de formas. Por ejemplo, se puede lograr el marcado uniendo covalentemente o no covalentemente una porción que proporciona directamente o indirectamente una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, la pareja de unión, compuesto de ensayo, 499E9 o anticuerpos para los mismos pueden estar marcados directa o indirectamente. Las posibilidades para el marcado directo incluyen  
20 grupos marcadores: marcadores radioactivos, tales como <sup>125</sup>I, enzimas (patente de EE.UU. N° 3.645.090), tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (patente de EE.UU. N° 3.940.475) capaces de monitorizar el cambio en la intensidad de la fluorescencia, el desplazamiento de la longitud de onda o la polarización de la fluorescencia. Las posibilidades para el marcado indirecto incluyen la biotinización de un constituyente seguida por la unión a avidina acoplada a uno de los grupos marcadores anteriores.

25 También existen numerosos métodos para separar la 499E9 unida de la libre, o alternativamente el compuesto de ensayo unido del libre. La 499E9 puede ser inmovilizada sobre varias matrices seguido por lavado. Las matrices adecuadas incluyen plásticos tales como una placa de ELISA, filtros y bolitas. Véase, por ejemplo, Cagan *et al.*, (eds.) (1993) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Chapter 2, Greene and Wiley, N.Y. Otras técnicas de separación  
30 adecuadas incluyen, sin limitación, el método de las partículas magnetizables de anticuerpo con fluoresceína descrito en Rattle *et al.* (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación de partículas magnéticas de anticuerpos dobles como la descrita en la patente de EE.UU. N° 4.659.678.

35 Los métodos para enlazar proteínas o sus fragmentos a los diferentes marcadores han sido descritos extensamente en la bibliografía y no requieren de una descripción detallada en la presente memoria. Muchas de las técnicas incluyen el uso de grupos carboxilos activados a través del uso de carbodiimida o ésteres activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres mediante la reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado, tal como cloroacetilo o una olefina activada, tal como maleimida, para el enlace, o similares. También serán útiles en estas aplicaciones las proteínas de fusión.

40 Otro aspecto de diagnóstico de esta invención incluye el uso de secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos tomadas de la secuencia de una 499E9. Estas secuencias pueden usarse como sondas para detectar niveles del mensaje de 499E9 en muestras de pacientes que se sospeche tengan un estado anormal, por ejemplo, cáncer o un problema de desarrollo. Puesto que el antígeno es un marcador para la activación, puede ser útil para determinar los números de  
45 células T activadas para determinar, por ejemplo, cuando pueda necesitarse una supresión adicional. La preparación de ambas secuencias de nucleótidos de RNA y DNA, el marcado de las secuencias y el tamaño preferido de las secuencias han recibido amplia descripción en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Langer-Safer *et al.* (1982) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 79:4381-4385; Caskey (1987) *Science* 236:962-967 y Wilchek *et al.*, (1988) *Anal. Biochem.* 171:1-32.

50 Igualmente se contemplan kits de diagnóstico que también pueden analizar la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. La diagnosis o prognosis puede depender de la combinación de indicaciones múltiples usadas como marcadores. Así, los kits pueden analizar combinaciones de marcadores. Véase, por ejemplo, Viallet *et al.*, (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97. Se pueden usar otros kits para evaluar subconjuntos de células T.

## 55 X. Métodos para aislar sondas de unión específicas de 499E9

La proteína 499E9 debe interactuar con un receptor en base, por ejemplo, a su similitud en estructura y función con otros antígenos de superficie de células que exhiben estructura similar y especificidad de expresión del tipo de  
60 célula. Los métodos para aislar un receptor se hacen disponibles por la capacidad de preparar 499E9 purificada para programas de escrutinio. Las construcciones solubles o de otro tipo que usen las secuencias de 499E9 proporcionadas en la presente descripción permitirán el escrutinio o aislamiento de receptores específicos de 499E9. Existen muchos métodos para la clonación por expresión, adherencia sobre plástico (*panning*), aislamiento por afinidad u otros medios para identificar un receptor.

65

## Ejemplos

*Métodos generales*

5 Algunos de los métodos estándares se describen o referencian, por ejemplo, en Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel *et al.* *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel *et al.*, (1987 and Supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, New York; Innis *et al.*, (eds.) (1990) *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*, Academic Press, N.Y. Los métodos para la purificación de proteínas incluyen métodos, tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, (1987 and Supplements); Deutscher (1990) “*Guide to Protein Purification*” en *Methods in Enzymology* vol. 182, y otros volúmenes de esta serie; y en la literatura del fabricante acerca del uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, N.J. o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permitirá la fusión a segmentos adecuados, por ejemplo, a una secuencia FLAG o un equivalente que pueda ser fusionado por medio de una secuencia eliminable por proteasa. Véase, por ejemplo, Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12:69-70; Hochuli (1990) “*Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent*” in Setlow (ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe *et al.*, (1992) *OlAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA. Se describen técnicas de cultivo de células en: Doyle *et al.*, (eds.) (1994) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons, NY.

Se describen análisis FACS en Melamed *et al.* (1990) *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, Inc., New York, NY; Shapiro (1998) *Practical Flow Cytometry*, Liss, New York, NY y Robinson *et al.* (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods*, Wiley-Liss, New York, NY. Se llevó a cabo el marcado fluorescente de reactivos adecuados mediante métodos estándares.

## Ejemplo 1

30 *Clonación de 499E9 de ratón*

La producción de células Th1 o Th2 3W se describe en Openshaw *et al.*, (1995) *J. Exp. Med* 182:1357-1367. Brevemente, se derivaron poblaciones de Th1 o Th2 de células CD4+ T estimuladas con antígeno y células que presentaban antígenos en presencia de IL-12 o IL4. Las células fueron estimuladas una vez a la semana durante 3 semanas, después se cosecharon y reestimularon, por ejemplo, con PMA e ionomicina durante 4 h. Véase, Murphy *et al.* (1996) *J. Exp. Med.* 183:901-913.

El RNA total puede ser aislado, por ejemplo, usando el procedimiento de gradiente de tiocianato de guanidina/CsCl como el descrito por Chigwin *et al.* (1978) *Biochem.* 18:5294-5299. Se aísla el RNA de Poly (A)+ usando, por ejemplo, el kit de aislamiento de RNAOLIGOTEX (QIAGEN). Dicho RNA de estas células se usa para sintetizar la primera cadena de cDNA, por ejemplo, usando como cebador NotI/Oligo-dT (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). El cDNA de doble cadena se sintetiza, se liga con adaptadores BstXI, se digiere con NotI, se fracciona por tamaños para > 0,5 kilobases (kb) y se liga en los sitios NotI/BstXI de pJFE-14, un derivado del vector pCDSR $\alpha$ . Véase, Takebe *et al.* (1985) *Mol. Cell Biol.* 8:466-472. Se usan células DH10 $\alpha$  de *E. coli* electrocompetentes (Gibco-BRL) para la transformación.

Clones independientes fueron escogidos al azar y escrutados mediante hibridación usando un cóctel de varios cDNA de citoquinas conocidos. Se prepararon DNA plasmídicos de clones que no se hibridaban a las sondas de citoquinas. Estos clones se agruparon por tamaño de inserto y se caracterizaron adicionalmente por secuenciación de DNA. Se aislaron las clones correspondientes a 499E9.

## Ejemplo 2

55 *Expresión celular de 499E9 de ratón*

Una sonda específica para cDNA que codifica 499E9 de ratón se usa para determinar la distribución en tejidos del mensaje que codifica el antígeno. Se pueden usar sondas de hibridación estándares para realizar un análisis Northern de RNA de fuentes adecuadas, en células, por ejemplo, estimuladas o en varios estados fisiológicos, en diversos tejidos, por ejemplo, bazo, hígado, timo, pulmón, etc., o en varias especies. Los análisis Southern de genotecas de cDNA también pueden proporcionar información de distribución valiosa. Los patrones de inmunotransferencia de tejidos normales o los patrones de inmunotransferencia de especies están disponibles comercialmente. Técnicas similares serán útiles para evaluar diagnósticos de estados médicos que puedan correlacionarse con la expresión en varios tipos de células.

65 También puede usarse análisis de PCR usando cebadores adecuados. Se puede usar análisis de anticuerpos, incluyendo inmunohistoquímica o FACS, para determinar la distribución en células o en tejidos.

## Ejemplo 3

*Purificación de la proteína 499E9*

5 Se escrutan líneas de células transfectadas múltiples para detectar una que exprese el antígeno, formas unida a membranas o solubles, a un alto nivel en comparación con otras células. Se escrutan varias líneas de células y se seleccionan por sus propiedades favorables en la manipulación. La 499E9 natural puede ser aislada de fuentes naturales o mediante la expresión de una célula transformada usando un vector de expresión adecuado. La purificación de la proteína expresada se logra mediante procedimientos normales, o puede combinarse con medios de ingeniería genética para una purificación eficaz de alta eficiencia a partir de lisados o líquidos sobrenadantes de células. Se pueden usar segmentos FLAG o His6 para dichas características de purificación.

## Ejemplo 4

15

*Aislamiento de genes de 499E9 homólogos*

Se puede usar el cDNA de 499E9 como una sonda de hibridación para escrutar una genoteca de una fuente deseada, por ejemplo, una genoteca de cDNA de células de primate. Pueden escrutarse muchas especies diferentes tanto para la rigurosidad necesaria para una fácil hibridación, como para la presencia usando una sonda. Se usan condiciones de hibridación adecuadas para seleccionar clones que exhiban especificidad de hibridación cruzada.

El escrutinio mediante hibridación o PCR usando sondas degeneradas en base a las secuencias de péptidos también permitirá el aislamiento adecuado de clones apropiados. Alternativamente, el uso de cebadores adecuados para el escrutinio por PCR proporcionará el enriquecimiento de clones de ácidos nucleicos adecuados.

Métodos similares son aplicables para aislar variantes de especies polimórficas o alélicas. Las variantes de especie se aíslan usando técnicas de hibridación de especie cruzada basadas en el aislamiento de un aislado de longitud completa o fragmento de una especie como una sonda.

30

Alternativamente, los anticuerpos producidos contra 499E9 de ratón se usarán para escrutar células que expresen proteínas de reacción cruzada partir de por ejemplo una genoteca de cDNA adecuada. La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante métodos normales como los descritos anteriormente. Los péptidos sintéticos o las proteínas purificadas se presentan a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Los anticuerpos resultantes se usan por ejemplo, para escrutinio, adherencia sobre plástico (*panning*) o clasificación.

## 40 Ejemplo 5

*Preparación de 499E9 específicas*

Péptidos sintéticos o proteína purificadas se presentan al sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology*, Wiley/Greene; and Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Spring Harbor Press. Se puede preparar suero policlonal o hibridomas. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión está marcado como se ha descrito anteriormente, por ejemplo por fluorescencia o de otro modo, o está inmovilizado en un sustrato para métodos de adherencia sobre plástico (*panning*).

50

## Ejemplo 6

*Aislamiento de un receptor para 499E9*

55 Se puede usar un producto de expresión de construcción de 499E9 como un reactivo de unión específico para identificar su pareja de unión, por ejemplo, un receptor, aprovechando su especificidad de unión, preferiblemente se podría usar un anticuerpo. Un reactivo de 499E9 se marca como se describió anteriormente, por ejemplo, mediante fluorescencia o de otra manera, o se inmoviliza en un sustrato para métodos de adherencia sobre plástico.

60 La composición de unión se usa para escrutar una genoteca de expresión hecha de una línea de células que expresa una pareja de unión, es decir, un receptor. Se usan técnicas de tinción normales para detectar o clasificar receptores intracelulares o expresados en superficie, o se escrutan por adherencia sobre plástico (*panning*) de células transformadas que se expresan en la superficie. El escrutinio de la expresión intracelular se realiza por diversos métodos de tinción o por inmunofluorescencia. Véase también, McMahan *et al.*, (1991) *EMBO J*, 10:2821-2832

65

Alternativamente, se usan reactivos de 499E9 para purificar por afinidad o clasificar células que expresen un receptor. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, o Ausubel *et al.*

## ES 2 305 009 T3

Otra estrategia es escrutar un receptor unido a una membrana mediante visualización. El cDNA que contiene el receptor de cDNA se construye como se describió anteriormente. El ligando puede ser inmobilizado y usarse para inmobilizar las células que se expresan. La inmobilización se puede lograr mediante el uso de anticuerpos apropiados que reconozcan, por ejemplo, una secuencia FLAG de una construcción de fusión de 499E9, o mediante el uso de anticuerpos producidos contra los primeros anticuerpos. Los ciclos recursivos de selección y amplificación conducen al enriquecimiento de las clones adecuados y al eventual aislamiento de clones de expresión del receptor.

Las genotecas de expresión de fago pueden ser escrutadas por 499E9. Las técnicas de marcado adecuadas, por ejemplo, anticuerpos anti-FLAG, permitirán el marcado específico de clones adecuados.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 305 009 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido sustancialmente puro o recombinante que exhibe por lo menos 85% de identidad de secuencia en una longitud de por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos con la SEQ ID NO: 2.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 16 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2.
- 10 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 30 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2.
4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.
- 15 5. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4,
6. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la proteína de fusión de la reivindicación 5.
- 20 7. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 6, que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:2.
8. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 7, que codifica la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.
- 25 9. Un vector recombinante que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
10. Una célula hospedante que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 o el vector de la reivindicación 9.
- 30 11. Un método de preparar un polipéptido o proteína de fusión, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 10 en condiciones en las cuales se expresa el ácido nucleico.
12. Un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno del mismo, que específicamente se une al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 35 13. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 5.
- 40 14. Un kit que comprende:
- a) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 5;
- 45 b) el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 12; o
- c) el ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8.
- 50
- 55
- 60
- 65

# ES 2 305 009 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácido nucleico de 499E9 de ratón.

5 La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de 499E9 de ratón.

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

10 (i) SOLICITANTE: Schering Corporation

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Antígenos de la superficie celular de mamíferos: Reactivos relacionados.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

15 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Schering-Plough Corporation

(B) CALLE: 2000 Galloping Hill Road

20 (C) CIUDAD: Kenilworth

(D) ESTADO: New Jersey

(E) PAÍS: EE.UU. de América

(F) CÓDIGO POSTAL: 07033-0530

25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete flexible.

(B) ORDENADOR: Apple Macintosh

30 (C) SISTEMA OPERATIVO: Macintosh 7.5.3

(D) PROGRAMA: Microsoft Word 6.0

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-DIC-1997

(C) CLASIFICACIÓN:

40 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD; US 60/0/32,846

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 13-DIC-1996

45 (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE

(A) NOMBRE: Thampoe, Immac J.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36,222

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: DX0686 PCT

50 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES.

(A) TELÉFONO: (908) 298-5061

(B) TELEFAX: (908) 298-5388

### 55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

60 (A) LONGITUD: 2191 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(ix) CARACTERÍSTICA:



ES 2 305 009 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 125...1072

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID. NO.1

5

GCCAGGACCT CTGTGAACCG GTCGGGGCGG GGGCCGCCTG GCCGGGAGTC TGCTCGGCGG  
60

10

TGGGTGGCCG AGGAAGGGAG AGAACGATCG CGGAGCAGGG CGCCCGAACT CCGGGCGCCG  
120

15

CGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG  
169

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser  
1 5 10 15

20

GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC  
217

Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His  
20 25 30

25

CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC  
265

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg  
35 40 45

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 305 009 T3

TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC  
 313  
 Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys  
 5 50 55 60

AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA  
 361  
 Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg  
 10 65 70 75

ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT  
 409  
 Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His  
 15 80 85 90 95

GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA  
 457  
 Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu  
 20 100 105 110

CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG  
 505  
 Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln  
 25 115 120 125

AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA  
 553  
 Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro  
 30 130 135 140

GCT ATG ATG GAA GGC TCA TGG TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT  
 601  
 Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro  
 35 145 150 155

GAG GCC CAG CCA TTT GCA CAC CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA  
 649  
 Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro  
 40 160 165 170 175

TCG GGT TCC CAT AAA GTC ACT CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC  
 697  
 Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly  
 45 180 185 190

TGG GCC AAG ATC TCT AAC ATG ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT  
 745  
 Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val  
 50 195 200 205

AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT  
 793  
 Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His  
 55 210 215 220

ES 2 305 009 T3

5 CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG  
 841  
 His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val  
 225 230 235

10 TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG  
 889  
 Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met  
 240 245 250 255

15 AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT  
 937  
 Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe  
 260 265 270

20 TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA  
 985  
 Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu  
 275 280 285

25 ATT AGC ATT CAG GTG TCC AAC CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT  
 1033  
 Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp  
 290 295 300

30 GCG ACG TAC TTT GGG GCT TTC AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT  
 1082  
 Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp  
 305 310 315

35 TTCGTGGAAC ATTAGCATGG ATGTCCTAGA TGTTTGGAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT  
 1142

40 GTCTATACAT GTGTAAGACT ACTAAGAGAC ATGGCCCACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC  
 1202

45 TCTCTCTTGA GCCTGTACAG GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTCAI  
 1262

50 GGTGATTACA CAACGGTTTT ACAATTTTGT AATGATTTC TAAGAATTGA ACCAGATTGC  
 1322

55 GAGAGGTATT CCGATGCTTA TGAAAACTT ACACGTGAGC TATGGAAGGG GGTCACAGTC  
 1382

60 TCTGGGTCTA ACCCCTGGAC ATGTGCCACT GAGAACCCTG AATTAAGAA GATGCCATG  
 1442

65 CATGCAAAG AAATGATAGT GTGAAGGGTT AAGTTCTTTT GAATTGTTAC ATTGCGCTG  
 1502

GACCTGCAAA TAAGTTCTTT TTTTCTAATG AGGAGAGAAA AATATATGTA TTTTATAT  
 1562

ES 2 305 009 T3

ATGTCATAAG TTATATTTCA GGTGTAATGT TTTCTGTGCA AAGTTTTGTA AATTATATTT  
1622

5 GTGCTATAGT ATTTGATTCA AAATATTTAA AAATGTCTCA CTGTTGACAT ATTTAATGTT  
1682

10 TTAAATGTAC AGATGTATTT AACTGGTGCA CTTTGTAAAT CCCCTGAAGG TACTCGTAGC  
1742

TAAGGGGGCA GAATACTGTT TCTGGTGACC ACATGTAGTT TATTTCTTTA TTCTTTTTAA  
1802

15 CTTAATAGAG TCTTCAGACT TGTCAAAACT ATGCAAGCAA AATAAATAAA TAAAAATAAA  
1862

20 ATGAATATCT TGAATAATAA GTAGGATGTT GGTACCAGG TGCCTTTCAA ATTTAGAAGC  
1922

TAATTGACTT TAGGAGCTGA CATAGCCAAA AAGGATACAT AATAGGCTAC TGAAAATCTG  
1982

25 TCAGGAGTAT TTATGCAATT ATTGAACAGG TGTCTTTTTT TACAAGAGCT ACAAATTGTA  
2042

30 AATTTTGTTT CTTTTTTTTT CCATAGAAAA TGTACTATAG TTTATCAGCC AAAAAACAAT  
2102

CCACTTTTTA ATTTAGTGAA AGTTATTTTA TTATACTGTA CAATAAAAGC ATTGTTTCTG  
2162

35 AATGGCATTT TTTGGTACTT AAAAAATGGC  
2191

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 316 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(C) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2

55 Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu  
1 5 10 15

Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro  
20 25 30

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser  
35 40 45

65 Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser

ES 2 305 009 T3

	50					55						60				
5	Ile 65	Ala	Leu	Phe	Leu	Tyr 70	Phe	Arg	Ala	Gln	Met 75	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile 80
	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr 85	His	Cys	Phe	Tyr	Arg 90	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Glu 95
10	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu	Glu 105	Ser	Glu	Asp	Thr	Leu	Pro 110
	Asp	Ser	Cys 115	Arg	Arg	Met	Lys	Gln	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Val	Gln	Lys 125
15	Glu	Leu	Gln	His	Ile	Val	Gly 135	Pro	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Ala 140
	Met 145	Met	Glu	Gly	Ser	Trp 150	Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Arg	Gly	Lys	Pro	Glu 160
25	Ala	Gln	Pro	Phe	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser 175
	Gly	Ser	His	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	Gly	Trp 185
30	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	Thr	Leu	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Arg	Val	Asn 195
	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	His	His 205
40	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Thr	Asp	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	Val	Tyr 210
	Val	Val	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Asn	Leu	Met	Lys 215
45	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Asn	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	Phe	Tyr 220
	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile 225
50	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp	Ala 230
	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Val	Gln	Asp	Ile	Asp				
55	305					310					315					

65