



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 770**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04772572 .6**
96 Fecha de presentación : **25.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1662007**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Preventivo o remedio para enfermedades inflamatorias del intestino que contiene anticuerpo anti-CD81 como principio activo.**

30 Prioridad: **28.08.2003 JP 2003-304264**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2011

73 Titular/es:
DAINIPPON SUMITOMO PHARMA Co., Ltd.
6-8, Dosho-Machi 2-chome
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8524, JP

72 Inventor/es: **Watanabe, Takamasa y**
Kikuchi, Kaoru

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 363 770 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

Preventivo o remedio para enfermedades inflamatorias del intestino que contiene anticuerpo anti-CD81 como principio activo

Campo técnico

En este documento se desvela un procedimiento para cribar una sustancia eficaz para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino (denominadas algunas veces en lo sucesivo "EII"), la sustancia obtenida mediante el procedimiento y un agente para prevenir, mejorar o tratar EII que contiene la sustancia obtenida mediante el procedimiento o un anticuerpo anti-CD81 como principio activo.

Adicionalmente se desvela un marcador de enfermedad útil para diagnosticar enfermedades inflamatorias del intestino (EII) y un procedimiento de detección (procedimiento de diagnóstico) de EII usando el marcador de enfermedad.

Técnica anterior

Los intestinos son órganos que digieren y absorben los nutrientes y el agua esenciales para las actividades de la vida de los organismos. Entretanto, también son órganos que tienen una acción de inmunodefensa para excluir sustancias extrañas tales como patógenos y mantener la conservación de la vida controlando cualidades contradictorias de un modo bien equilibrado. Sin embargo, se sabe que cuando el equilibrio de estas funciones se convierte en anómalo, este equilibrio dinámico se rompe para inducir diversas enfermedades del intestino. Especialmente, con respecto a las enfermedades inflamatorias del intestino (abreviadas EII) cuyos pacientes han aumentado en número en los últimos años, una farmacoterapia usando preparaciones farmacéuticas de ácido 5-aminosalicílico tales como sulfasalazina, esteroides y similares no puede proporcionar efectos terapéuticos satisfactorios. Por consiguiente, las enfermedades han sido tratadas por enterectomía, leucaféresis o similares y, por tanto, se han requerido agentes más eficaces.

Las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) se agrupan, en vista de los estados patógenos de las mismas, en colitis ulcerosa (abreviada CU) y enfermedad de Crohn (abreviada EC). En los últimos años se ha sabido que las preparaciones farmacéuticas de proteínas tales como un anticuerpo anti-TNF son eficaces como agente terapéutico de enfermedad de Crohn (Lancet. 342, 173-174, 1993). Sin embargo, son agentes costosos y sólo se aplican a pacientes con resistencia a esteroides. El efecto contra la colitis ulcerosa también es débil. Por tanto, todavía no se ha presentado un tratamiento médico satisfactorio. Las enfermedades inflamatorias del intestino son enfermedades que repiten la remisión y el recrudescimiento, son muy pobres en QOL (=calidad de vida) y todavía tienen un bajo grado de satisfacción en lo referente a la farmacoterapia. Por consiguiente, el desarrollo de un agente terapéutico eficaz tiene una gran demanda en el cuidado médico.

Además, una reacción a la farmacoterapia varía con los pacientes individuales, y hay pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que no reaccionan a la farmacoterapia en todos los agentes terapéuticos que han sido actualmente usados. En vista del análisis de polimorfismo de genes y la sensibilidad a enfermedad, hay casos en los que se considera que el polimorfismo de interleucina-1 o el polimorfismo del gen NOD2 son un gen causal de enfermedad. Por tanto, en estudios médicos básicos está aclarándose que hay una diferencia en los antecedentes genéticos para la afectación del estado patógeno entre pacientes individuales (Current Opinion in Anti-inflammatory & Immunomodulatory Investigational Drugs. 2, 272-274, 2000).

En el actual cuidado médico se ha requerido seleccionar exactamente un procedimiento terapéutico que se adapte a los síntomas de pacientes individuales sin limitarlo a enfermedades inflamatorias del intestino (EII). En los últimos años se ha reconocido la necesidad de mejora de la QOL (calidad de vida) en la sociedad de edad avanzada y se ha demandado de todo corazón aplicar no una terapia común a todos los pacientes, sino una terapia apropiada para adaptarse a los síntomas de pacientes individuales. Para realizar una llamada terapia confeccionada a medida es fructífero un marcador de enfermedad que refleje exactamente los síntomas de pacientes individuales o las causas (antecedentes genéticos) de los mismos, y actualmente se han realizado asiduamente estudios destinados a la búsqueda y el desarrollo de la misma.

CD81 es una molécula de superficie de 26 kDa que se expresa en una amplia gama de células, y tiene una actividad de disminuir un umbral de activación de linfocitos B formando un complejo con CD21, CD19 y Leu 13 en un linfocito B. Un linfocito T está asociado a CD4 y CD8 para transmitir una información de estímulo a las células. En vista de estos asuntos, CD81 se considera que tiene una función significativa en una respuesta inmunitaria a un heteroantígeno. Además, participa fisiológicamente y funcionalmente en diversas integrinas para activar VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$) en un linfocito B o LFA-1 (integrina $\alpha L\beta 2$) en un timocito.

Como enfermedad asociada a CD81 se menciona el tipo C de hepatitis. Se ha informado que el cribado de una molécula de unión a E2 se realiza a partir de una biblioteca de expresión de ADNc derivada de un linfoma T humano (clon de células que tiene una alta afinidad con E2) usando una región de la proteína de la envuelta E2 del virus del

tipo C de hepatitis (VHC) como una sonda para unir una molécula CD81 humana a E2 y que una región de unión a E2 de una molécula CD81 tal se une a un ARN del VHC y esta unión es inhibida con un anticuerpo de neutralización de la infección por el VHC (Science 282, 938-941, 1998). Es decir, se sabe que CD81 actúa de receptor del VHC para participar en el desencadenamiento del tipo C de hepatitis C.

También se sabe que una enfermedad autoinmunitaria se convierte en grave por la infección por el VHC, y se ha informado que CD81 está relacionado con un grado de gravedad en infección por el VHC crónica y CD81 está relacionado con un factor reumático (Clinical & Experimental Immunology. 128 (2): 353-8, 2000). También hay un informe que establece que la infección por el VHC puede ser un factor peligroso de enfermedades inflamatorias del intestino (Gastroenterologie Clinique et Biologique. 24(1): 77-81, 2000).

Divulgación de la invención

En el presente documento se desvela un procedimiento para cribar un agente útil para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino. Un objeto de la invención es proporcionar un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades.

También se desvela un marcador de enfermedad útil para diagnosticar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino, y un procedimiento de detección (procedimiento de diagnóstico de genes) de enfermedades inflamatorias del intestino usando el marcador de enfermedad.

Los presentes inventores han realizado asiduamente investigaciones para resolver los problemas anteriores y, por consiguiente, han encontrado que la expresión de un gen CD81 cuya relación con enfermedades inflamatorias del intestino (EII) era hasta ahora desconocida es significativamente elevada en células patógenas para EII en comparación con células no patógenas para EII. Como se describirá en los ejemplos, células patógenas para EII significa una población de células que tiene una capacidad para inducir EII por transferencia en un animal normal, y células no patógenas para EII significa una población de células que no induce EII incluso por transferencia a un animal normal. Específicamente, las células patógenas para EII incluyen células obtenidas por incubación de células linfáticas derivadas de un ratón afectado por EII mediante estimulación con enterotoxina B estafilocócica (SEB). Las células no patógenas para EII incluyen células obtenidas por incubación de células linfáticas derivadas de un ratón afectado por EII sin estimulación o mediante estimulación con SEB en presencia de 3-cloro-2-[1-(4-morfolin-4-ilfenil)ciclobutil]-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirimidina (denominado algunas veces en lo sucesivo de forma abreviada "compuesto A"), un compuesto del documento JP-A-2002-161084 cuya actividad es conocida por inhibir una inducibilidad por EII.

Los presentes inventores han encontrado adicionalmente que el compuesto A inhibe la formación de interferón γ , una citocina inflamatoria en células positivas para CD81 de linfocitos T positivos para CD3, y han aclarado que un anticuerpo anti-CD81 es eficaz para el tratamiento de animales del modelo de enfermedad inflamatoria del intestino.

Como se ha establecido anteriormente, los presentes inventores han aclarado que un sistema de cribado usando inhibición de la expresión de un gen CD81, inhibición de la expresión de una proteína codificada por el gen o inhibición de una función (actividad) de la misma como índice es eficaz para buscar un agente para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino (EII) basándose en un nuevo mecanismo. Han obtenido adicionalmente hallazgos de que un anticuerpo anti-CD81 es útil como agente para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino y un gen CD81 o un producto de expresión (proteína) de CD81 es un marcador de enfermedad excelente de enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

La invención se ha completado basándose en tales hallazgos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD81 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir, mejorar o tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII). La presente invención también se refiere a un anticuerpo anti-CD81 para uso en prevenir, mejorar o tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Preferentemente, CD81 es CD81 de mamífero. El anticuerpo anti-CD81 es preferentemente un anticuerpo monoclonal. La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que va a prevenirse, mejorarse o tratarse puede ser colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

Además, en este documento se desvela:

(1) un procedimiento para cribar una sustancia que reduce la expresión del gen CD81 que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con células que pueden expresar el gen CD81,

(b) una etapa de medir una cantidad de expresión del gen CD81 en las células puestas en contacto con la sustancia de prueba y comparar la cantidad con una cantidad de la expresión génica correspondiente en células de control no puestas en contacto con la sustancia de prueba, y

(c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que reduce la cantidad de expresión del gen

CD81 basándose en los resultados de comparación en (b),

(2) un procedimiento para cribar una sustancia que reduce la expresión de CD81 que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con células que pueden expresar CD81,

(b) una etapa de medir una cantidad de expresión de CD81 en las células puestas en contacto con la sustancia de prueba y comparar la cantidad de expresión con una cantidad de expresión de la proteína en células de control no puestas en contacto con la sustancia de prueba, y

(c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que reduce la cantidad de expresión de CD81 basándose en los resultados de comparación en (b),

(3) un procedimiento para cribar una sustancia que inhibe la función (actividad) de CD81 que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con CD81,

(b) una etapa de medir la función (actividad) de CD81 producida por la etapa en (a) anterior, y comparar la función (actividad) con la función (actividad) de CD81 no puesta en contacto con la sustancia de prueba, y

(c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que inhibe la función (actividad) de CD81 basándose en los resultados de comparación en (b),

(4) un procedimiento para cribar del punto (3) anterior, en el que la función (actividad) de CD81 es una actividad, función de unión a fibronectina,

(5) un procedimiento para cribar del punto (3) anterior, en el que la función (actividad) de CD81 es una actividad, función de unión a célula,

(6) un procedimiento para cribar uno cualquiera del punto (3) a (5) anterior, en el que linfocito B se usa como una célula que expresa CD81, (5),

un procedimiento para cribar un agente como principio activo para prevenir, mejorar o tratar EII descritas en uno cualquiera del punto (1) a (6) anterior,

(8) un agente para prevenir, mejorar o tratar EII que comprende una sustancia que reduce la expresión del gen CD81 como principio activo,

(9) el agente para prevenir, mejorar o tratar EII del punto anterior (8), en el que la sustancia que reduce la expresión del gen CD81 puede obtenerse mediante el procedimiento del punto anterior (1),

(10) un agente para prevenir, mejorar o tratar EII que comprende una sustancia que reduce la expresión de CD81 o función (actividad) de CD81 como principio activo,

(11) el agente para prevenir, mejorar o tratar EII del punto anterior (10), en el que la sustancia que reduce la expresión de CD81 o función (actividad) de CD81 puede obtenerse mediante el procedimiento del punto anterior (2) o (3),

(12) el agente para prevenir, mejorar o tratar EII del punto (10) anterior que comprende un anticuerpo anti-CD81 como principio activo,

(13) el agente para prevenir, mejorar o tratar EII del punto (12) anterior, en el que el anticuerpo anti-CD81 es un anticuerpo contra CD81 de mamífero,

(14) el agente para prevenir, mejorar o tratar EII del punto (8) anterior que comprende polinucleótidos antisentido que contienen una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia de bases de CD81 o una parte de la misma como principio activo,

(15) un marcador de enfermedad para enfermedad inflamatoria del intestino (denominada en lo sucesivo, EII) que comprende un polinucleótido que tiene 15 bases continuas y/o un polinucleótido complementario al mismo en la secuencia de bases del gen CD81,

(16) el marcador de enfermedad del punto (15) anterior que se usa como sonda o cebador para diagnosticar EII,

(17) un procedimiento para diagnosticar EII que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de unir un ARN preparado a partir de una biopsia de un sujeto o un polinucleótido complementario transcrito a partir del mismo al marcador de enfermedad del punto (15) o (16) anterior,

(b) una etapa de medir el ARN derivado de la biopsia o el polinucleótido complementario transcrito a partir del ARN en la que el ARN o el polinucleótido está unido al marcador de enfermedad, usando el marcador de enfermedad como índice, y

(c) una etapa de juzgar la afectación de EII basándose en los resultados de medición en (b),

(18) el procedimiento para diagnosticar EII del punto (17) anterior, en el que la etapa de juzgar la afectación de EII descrita en (c) se realiza comparando el resultado de medición del sujeto con un resultado de medición de una persona normal, y luego se realiza usando un aumento de una cantidad unida al marcador de enfermedad como índice,

(19) un marcador de enfermedad que comprende un anticuerpo que reconoce CD81,

(20) el marcador de enfermedad del punto (19) anterior que se usa como sonda para diagnosticar EII,

(21) un procedimiento para diagnosticar EII que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de unir una proteína preparada a partir de una biopsia de un sujeto al marcador de

enfermedad del punto (19) o (20) anterior,
 (b) una etapa de medir la proteína derivada de la biopsia unida al marcador de enfermedad usando el marcador de enfermedad como índice, y
 (c) una etapa de juzgar la afectación de EII basándose en los resultados de medición en (b),

5 (22) el procedimiento para diagnosticar EII del punto (21) anterior, en el que la etapa de juzgar la afectación de EII descrita en (c) se realiza comparando el resultado de medición del sujeto con un resultado de medición de una persona normal, y luego se realiza usando un aumento de una cantidad unida al marcador de enfermedad como índice.

10 En el presente documento se desvela como se mencionan anteriormente un sistema de cribado de una sustancia que reduce la expresión de un gen CD81, un sistema de cribado de una sustancia que inhibe la expresión o una función (actividad) de CD81, un agente para prevenir, mejorar o tratar EII, que contiene una sustancia encontrada en estos sistemas de cribado como principio activo, y un agente para prevenir, mejorar o tratar EII, que contiene un anticuerpo anti-CD81 como principio activo. Además, proporciona un marcador de enfermedad de EII, y un sistema
 15 de detección de las enfermedades.

La invención se basa como se ha establecido anteriormente en los hallazgos de que la expresión del gen CD81 en las células patógenas para EII aumenta en comparación con las células no patógenas para EII y el anticuerpo anti-CD81 presenta el efecto terapéutico en animales del modelo de enfermedad inflamatoria del intestino.

20 Por consiguiente, el gen CD81, sus productos de expresión y derivados de los mismos (por ejemplo, fragmentos de genes y anticuerpos) son útiles para cribar sustancias que reducen la expresión del gen CD81 o para cribar sustancias que inhiben la expresión o función (actividad) de CD81, y las sustancias obtenidas por los cribados son eficaces como agente para prevenir, mejorar y tratar enfermedades inflamatorias del intestino. Además, un anticuerpo anti-CD81 o ácidos nucleicos antisentido (nucleótidos antisentido) del gen CD81 son útiles como agente
 25 para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino.

Además, el gen CD81, sus productos de expresión (proteínas, polipéptidos y oligopéptidos) pueden usarse eficazmente para elucidar, diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades inflamatorias del intestino (EII), y mediante el uso de los mismos puede obtenerse información provechosa y clínicamente rentable o procedimientos. La detección de la expresión del gen o sus productos de expresión, o la detección de la mutación del gen o su anomalía en la expresión, pueden utilizarse eficazmente para la elucidación y el diagnóstico de enfermedades inflamatorias del
 30 intestino.

35 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

En la presente memoria descriptiva, los aminoácidos, (poli)péptidos, (poli)nucleótidos y similares se indican por las abreviaturas según la regulación de la IUPAC-IUB [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)], "Guideline for making specifications etc. including base sequences or amino acid
 40 sequences" (compilado por la oficina de patente japonesa) y símbolos comunes en el campo en cuestión.

En la memoria descriptiva, el "gen" o "ADN" se usa de forma que incluya no sólo un ADN bicatenario, sino también ADN monocatenarios respectivos, una cadena codificante y una cadena no codificante que constituyen el ADN bicatenario. No está particularmente limitado por la longitud de la misma. Por consiguiente, el gen (ADN) en la memoria descriptiva incluye, a menos que se informe de otro modo, todo el ADN bicatenario que incluye un ADN genómico humano, un ADN monocatenario (cadena más) que incluye un ADNc, un ADN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena más (cadena complementaria) y fragmentos de la misma. Además, el "gen" o "ADN" incluye no sólo un "gen" o "ADN" indicado por una secuencia de bases específica (SEC ID N°: 1), sino también un "gen" o "ADN" que codifica proteínas que tienen una función biológica igual a la de proteínas así
 45 codificadas [por ejemplo, especies homólogas (homólogos, variantes de corte y empalme y similares), mutantes y derivados]. El "gen" o "ADN" que codifica tales especies homólogas, mutantes o derivados puede incluir un "gen" o "ADN" que tiene una secuencia de bases que va a hibridarse con la secuencia complementaria de la secuencia de bases específica de SEC ID N°: 1 bajo condiciones rigurosas que van a describirse después en (3-1).

55 Por ejemplo, un gen que codifica un homólogo de una proteína humana puede incluir genes de diferentes organismos tales como un ratón y una rata, correspondientes al gen humano que codifica la proteína. Estos genes (homólogos) pueden identificarse por HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>). Específicamente, una secuencia de bases humana específica se aplica a BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para obtener un número de acceso de una secuencia coincidente (la puntuación es la mayor, el valor de E es 0 y la identidad indica 100%). Este número de acceso se entra en UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), y la ID de la agrupación de UniGene obtenida (número indicado en Hs.) se entra en HomoloGene. De la lista resultante que muestra una correlación de homólogos de genes de genes de diferentes organismos y el gen humano, los genes de diferentes organismos tales como un ratón y una rata pueden seleccionarse como genes (homólogos) correspondientes al gen humano indicado por la secuencia de bases
 60 específica.

El gen o ADN puede incluir una región de control de la expresión, una región de código, un exón o un intrón sin cuestionar una región funcional.

5 Si el término “gen CD81” o “ADN de CD81” se usa en la memoria descriptiva, se usa, a menos que se informe de otro modo, de forma que incluya un gen (ADN) CD81 humano indicado por la secuencia de bases específica (SEC ID N° 1) y un gen (ADN) que codifique sus especies homólogas, mutantes y derivados. Específicamente incluye el gen CD81 humano (n° de acceso de GenBank NM_004356) descrito en SEC ID N°: 1, su homólogo de ratón y homólogo de rata, etc.

10 En la memoria descriptiva, el “polinucleótido” se usa de forma que incluya tanto de un ARN como de un ADN. El ADN incluye todos de un ADNc, un ADN genómico y un ADN sintético. El ARN incluye todos de un ARN total, un ARNm, un ARNr y un ARN sintético.

15 En la memoria descriptiva, la “proteína” o el “(poli)péptido” incluye no sólo una “proteína” o un “(poli)péptido” indicado por una secuencia de aminoácidos específica (SEC ID N°: 2), sino también sus especies homólogas (homólogos y variantes de corte y empalme), mutantes, derivados, sustancias maduras, sustancias modificadas con aminoácidos y similares, mientras que estos sean iguales a los mismos en funciones biológicas. Los homólogos aquí pueden incluir proteínas de diferentes organismos tales como un ratón y una rata, correspondientes a la proteína humana. Pueden identificarse por deducción a partir de las secuencias de bases de genes identificadas por HomoloGene (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/). Los mutantes incluyen todos los mutantes presentes en la naturaleza, mutantes no presentes en la naturaleza y mutantes que tienen secuencias de aminoácidos que se modifican por delección, sustitución, adición o inserción artificial. Además, los mutantes pueden incluir aquellos que son homólogos a proteínas o (poli)péptidos sin mutación al menos el 70%, preferentemente el 80%, más preferentemente el 95%, adicionalmente preferentemente el 97%. Las sustancias modificadas con aminoácidos incluyen sustancias modificadas con aminoácidos presentes en la naturaleza y sustancias modificadas con aminoácidos no presentes en la naturaleza. Específicamente pueden mencionarse fosfatos de aminoácidos.

20 Cuando el término “proteína de CD81” o solo “CD81” se usa en la memoria descriptiva, se usa, a menos que se informe de otro modo, de forma que incluya CD81 humano indicado por la secuencia de aminoácidos específica (SEC ID N° 2) y sus especies homólogas, mutantes, derivados, sustancias maduras y sustancias modificadas con aminoácidos. Específicamente, CD81 humano que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID N°: 2 (n° de acceso de GenBank P18582), y su homólogo de ratón y homólogo de rata.

30 El “anticuerpo” citado en la memoria descriptiva incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario y una parte del anticuerpo que tiene una afinidad por antígeno, tal como un fragmento Fab o un fragmento formado por una biblioteca de expresión de Fab.

35 El “anticuerpo anti-CD81” en la memoria descriptiva incluye un anticuerpo que reconoce específicamente CD81. Específicamente incluye un anticuerpo que puede reconocer específicamente un producto de expresión (proteína) del gen CD81 (éste también se denomina en lo sucesivo “CD81” en la memoria descriptiva).

40 “EII” en la memoria descriptiva es la abreviatura de una enfermedad inflamatoria del intestino. En Japón se llama enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino incluye, en vista del estado patógeno, colitis ulcerosa (abreviada CU) y enfermedad de Crohn (abreviada EC).

45 El “marcador de enfermedad” en la memoria descriptiva es uno que se usa directamente o indirectamente para diagnosticar la presencia o la ausencia de la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), un grado de afectación, la presencia o la ausencia de mejoría y un grado de mejoría, y para cribar un sustancia candidata útil para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Incluye polinucleótidos, oligonucleótidos o anticuerpos que pueden reconocer específicamente y unirse a genes o proteínas cuya expresión varía *in vivo*, especialmente en el tejido del intestino grueso con respecto a la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Estos polinucleótidos, oligonucleótidos y anticuerpos pueden usarse eficazmente basándose en las anteriores propiedades como una sonda para detectar el gen o proteínas expresadas *in vivo*, en tejidos o en células, y los oligonucleótidos pueden usarse eficazmente como un cebador para amplificar el gen expresado *in vivo*.

55 Además, la “biopsia” que va a diagnosticarse se refiere a un tejido en el que la expresión del gen CD81 aumenta con la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Específicamente se refiere a un tejido del intestino grueso y a sus tejidos de alrededor.

60 Con respecto al gen (polinucleótido) CD81, su producto de expresión (CD81) y sus derivados (anticuerpo anti-CD81 y similares), el uso específico del mismo se describe más adelante.

(1) Procedimiento de cribado de un agente candidato

65 (1-1) Procedimiento de cribado usando un nivel de expresión génica como índice

En el presente documento se desvela un procedimiento para cribar una sustancia que reduce la expresión del gen CD81.

El procedimiento de cribado incluye las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con células que pueden expresar el gen CD81,
- (b) una etapa de medir una cantidad de la expresión del gen CD81 en las células puestas en contacto con la sustancia de prueba y comparar la cantidad con una cantidad de la expresión génica correspondiente en células de control no puestas en contacto con la sustancia de prueba, y
- (c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que reduce la cantidad de la expresión del gen CD81 basándose en los resultados de comparación en (b).

Las células usadas en el cribado pueden incluir todas las células de cultivo, tanto endógenas como exógenas, que expresan el gen CD81. La expresión del gen CD81 puede reconocerse fácilmente detectando la expresión génica del mismo por el conocido procedimiento de transferencia Northern o procedimiento de RT-PCR. Ejemplos específicos de las células usadas en el cribado puede incluir (A) células derivadas de tejido intestinal o tejido linfático y preparadas a partir de un modelo animal de enfermedad inflamatoria del intestino (EII), (B) células derivadas de tejido intestinal o tejido linfático tratadas o sin tratar con diversos estimulantes, y (C) células con cualquiera de los genes descritos en este documento introducidos.

Aquí, como modelo animal de EII mostrado en (A) puede usarse cualquiera de los modelos animales conocidos como modelos animales de EII. Ejemplos específicos de los mismos pueden incluir modelos de EII de afectación espontáneo (ratones C3H/HeJBir, tamarinos de cabeza de algodón y similares), modelos inducidos por sustancias químicas [modelos inducidos por dinitroclorobenceno (ratas), modelos de ácido acético (ratas), modelos inducidos por ácido trinitrobenzenosulfónico (ratones, ratas y conejos), modelos inducidos por sulfato de dextrano (ratones, ratas y hámsteres), modelos inducidos por carragenina (ratas y cobayas) y modelos inducidos por indometacina (ratas) y similares], transgénicos/mutantes (ratones de genes inactivados para IL-2, ratones de genes inactivados para IL-10, ratones de genes inactivados para TCR y similares) o modelos de transferencia de células (ratones SCID transfundidos con CD45RBhi y similares). Ejemplos preferibles de las células derivadas de tejido intestinal pueden incluir células de cultivo primario derivado de intestino grueso (colon).

Las células derivadas de tejido intestinal mostradas en (B) incluyen preferentemente cepas de células derivadas de intestino grueso (colon). Ejemplos específicos de las mismas puede incluir células Caco-2 (derivadas de cáncer de las glándulas del colon, ATCC nº HTB-37), células HT-29 (derivadas de cáncer de las glándulas del colon humano, ATCC nº HTB-38), células COLO 205 (derivadas de cáncer de las glándulas del colon humano, ATCC nº CCL-222) y similares. Las células derivadas de tejido linfático son preferentemente linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y cepas de células de los mismos. Ejemplos específicos de los mismos puede incluir células RAW 264.7 (derivadas de monocitos de ratón, ATCC nº TIB-71), células U-937 (derivadas de leucemia histiocítica humana, ATCC nº CRL-1593.2), células THP-1 (derivadas de monocitos humanos, ATCC nº TIB-202), células de Jurkat (derivadas de leucemia de linfocitos T humana, ATCC nº TIB-152) y similares. Ejemplos específicos del estimulante pueden incluir lipopolisacárido (LPS), ésteres de forbol (PMA y similares), ionóforo de calcio, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , IFN γ y similares) y similares. Se sabe que las células se convierten en un estado activado más próximo a una atmósfera de un sitio inflamatorio.

Ejemplos de las células con el gen introducido descritas en este documento mostradas en (c) puede incluir, además de las células mostradas en (A) y (B), células huésped generalmente usadas en la introducción de genes, concretamente, células derivadas de ratón y células derivadas de rata tales como L-929 (derivadas de un tejido conjuntivo, ATCC nº CCL-1), C1271 (derivadas de un tejido de cáncer de mama, ATCC nº CRL-1616), Sp2/0-Ag14 (derivadas de mieloma, ATCC nº CRL-1581) y NIH3T3 (derivadas de un tejido fetal, ATCC nº CRL-1658), células derivadas de hámster tales como BHK-21 (derivadas de tejido renal de riñón de hámster sirio, ATCC nº CCL-10) y CHO-K1 (derivadas de un ovario de hámster chino, ATCC nº CCL-61), células derivadas de mono tales como COS1 (derivadas de un tejido renal de un mono verde africano, ATCC nº CRL-1650), CV1 (derivadas de un tejido renal de un mono verde africano, ATCC nº CCL-70) y Vero (derivadas de un tejido renal de un mono verde africano, Daiinippon Pharmaceutical Co., Ltd.), células humanas tales como HeLa (derivadas de cáncer del cuello del útero, Daiinippon Pharmaceutical Co., Ltd.) y 293 (derivadas de un riñón fetal, ATCC nº CRL-1573) y células derivadas de insecto tales como Sf9 (Invitrogen Corporation) y Sf21 (Invitrogen Corporation).

Además, las células usadas en el procedimiento de cribado desvelado en este documento también incluyen un tejido que es una agregación de células, y similares.

La sustancia de prueba (sustancia candidata) que va a cribarse mediante el procedimiento de cribado no está limitada, e incluye un ácido nucleico (incluyendo un nucleótido antisentido del gen CD81), un péptido, una proteína, un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y similares. El cribado se realiza específicamente poniendo en contacto estos compuestos de prueba o muestras (muestras de prueba) que contienen los mismos con las anteriores células y/o tejidos. Ejemplos de tales muestras de prueba incluyen un extracto de células, un producto de

expresión de una biblioteca de genes, un compuesto sintético de bajo peso molecular, un péptido sintético, un compuesto natural y similares que contienen la sustancia de prueba, pero no se limitan a ellos.

5 En el cribado descrito en este documento, las condiciones bajo las que la sustancia de prueba se pone en contacto con células no están particularmente limitadas. Es preferible seleccionar condiciones de cultivo (temperaturas, pH, una composición del medio y similares) bajo las que las células no estén muertas y el gen CD81 pueda expresarse.

10 Como se demostrará en los ejemplos, la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en las células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII), y el anticuerpo anti-CD81 presenta un efecto terapéutico en los animales del modelo de EII. A partir de este hallazgo, la expresión del gen CD81 se considera que tiene una relación causal con las enfermedades inflamatorias del intestino (EII). Por consiguiente, el procedimiento de cribado descrito en este documento incluye un procedimiento para buscar una sustancia que reduce la expresión del gen CD81 (una sustancia que devuelve el nivel de expresión al nivel normal) usando el nivel de expresión del gen CD81 como índice. La sustancia candidata que tiene una actividad de alivio/inhibitoria de EII (que presenta un efecto de mejoría/tratamiento para EII) puede proporcionarse por este procedimiento de cribado.

20 Es decir, el procedimiento de cribado descrito en este documento es para proporcionar la sustancia candidata que se convierte en un principio activo de un agente para prevenir, mejorar o tratar EII buscando la sustancia que reduce la expresión del gen CD81.

25 La sustancia candidata puede seleccionarse específicamente usando como índice el hecho de que el nivel de expresión del gen CD81 de la célula que contiene el compuesto de prueba es inferior al mismo nivel de una célula sin sustancia de prueba. Si se usa una célula que requiere una sustancia inductora de la expresión en la expresión del gen CD81, la selección puede realizarse usando como índice el hecho de que la expresión inducida en presencia de una sustancia inductora de la expresión [por ejemplo, lipopolisacárido (LPS), ésteres de forbol (PMA y similares), ionóforo de calcio, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF α y IFN γ) y similares] es inhibida en presencia de la sustancia candidata, es decir, la expresión del gen CD81 de las células puestas en contacto con la sustancia candidata bajo condiciones inductoras de la expresión disminuye en comparación con la de las células de control (control más) no puestas en contacto con la sustancia de prueba en presencia de la sustancia inductora de la expresión.

35 La detección y la determinación cuantitativa del nivel de expresión génica en el procedimiento de cribado desvelado en este documento puede realizarse según un procedimiento conocido tal como un procedimiento de transferencia Northern, un procedimiento de RT-PCR o un procedimiento usando un chip de ADN como se describirá posteriormente en (4-1) usando el ARN preparado a partir de las células o el polinucleótido complementario transcrito a partir del ARN y el marcador de enfermedad de la invención. Con respecto al grado de cambio (inhibición o disminución) en el nivel de expresión génica como índice puede mostrarse que la expresión del gen CD81 en las células puestas en contacto con la sustancia de prueba (sustancia candidata) disminuye (se inhibe o se reduce) el 10% o más, preferentemente el 30% o más, especialmente preferentemente el 50% o más en comparación con la cantidad de expresión en las células de control no puestas en contacto con la sustancia de prueba (sustancia candidata).

45 La detección y la determinación cuantitativa del nivel de expresión del gen CD81 también puede realizarse midiendo una actividad de una proteína derivada de un gen marcador tal como un gen luciferasa usando una cepa de células que tiene introducidas en ellas un gen de fusión en el que el gen marcador está unido a la región del gen que controla la expresión del gen CD81 (región que controla la expresión). El procedimiento de cribado desvelado en este documento de la sustancia inhibidora de la expresión del gen CD81 también incluye un procedimiento para buscar una sustancia diana usando la cantidad de expresión del gen marcador como índice. En este sentido, el concepto del "gen CD81" descrito en este documento incluye el gen de fusión de la región que controla la expresión del gen CD81 y el gen marcador.

50 Como gen marcador es preferible un gen estructural de una enzima que cataliza una reacción luminosa o una reacción de color. Ejemplos específicos de los mismos incluyen, además del gen luciferasa, genes indicadores tales como un gen fosfatasa alcalina secretor, un gen cloranfenicol-acetil-transferasa, un gen β -glucuronidasa, un gen β -galactosidasa y un gen aequorina.

60 Como región que controla la expresión del gen CD81 aquí puede usarse una región de aproximadamente 1 kb, preferentemente aproximadamente 2 kb en la dirección 5' de un sitio de inicio de la transcripción del gen CD81. La región que controla la expresión del gen CD81 puede identificarse, por ejemplo, por un procedimiento que comprende (i) una etapa de determinar el extremo 5' por un procedimiento convencional tal como un procedimiento 5'-RACE [realizado usando, por ejemplo, el kit 5' full Race Core (fabricado por Takara Shuzo)], un procedimiento de tapado de oligonucleótidos o un mapeo del cebador S1; y (ii) una etapa de obtener la región del extremo 5' con el kit Genome Walker (fabricado por Clontech) o similares y medir una actividad del promotor de la región del extremo 5' resultante. La formación del gen de fusión y la medición de la actividad del gen marcador pueden realizarse mediante procedimientos conocidos.

Las sustancias seleccionadas por el procedimiento de cribado desvelado en este documento pueden considerarse como un inhibidor de la expresión génica del gen CD81. Estas sustancias inhiben la afectación o la progresión de trastornos del tejido del intestino grueso inhibiendo la expresión del gen CD81 de manera que se conviertan en potentes sustancias candidatas de un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

(1-2) Procedimiento de cribado usando una cantidad de expresión de proteína como índice

En el presente documento se desvela un procedimiento para cribar una sustancia que reduce la expresión de CD81 (proteína CD81).

El procedimiento de cribado comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c).

- (a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con células que pueden expresar CD81,
- (b) una etapa de medir una cantidad de expresión de CD81 en las células puestas en contacto con la sustancia de prueba y comparar la cantidad de expresión con una cantidad de expresión de la proteína en células de control no puestas en contacto con la sustancia de prueba, y
- (c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que reduce la cantidad de expresión de CD81 basándose en los resultados de comparación en (b).

Las células usadas en el cribado pueden incluir todas las células de cultivo, tanto endógenas como exógenas, que expresan el gen CD81 y tienen CD81 como producto de expresión. La expresión de CD81 puede identificarse fácilmente detectando la proteína como producto génico por el procedimiento de transferencia Western conocido. Ejemplos específicos de las células incluyen las células mostradas en (1-1) antes. Las células también incluyen fracciones de la membrana celular, fracciones de citoplasma, fracciones del núcleo de la célula y similares.

Como se muestra en los ejemplos, la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en las células patógenas para EII en comparación con las células no patógenas para EII, y el anticuerpo anti-CD81 muestra el efecto terapéutico en animales del modelo de EII. A partir de estos hallazgos, la expresión de CD81 se considera que tiene una relación causal con las enfermedades inflamatorias del intestino (EII). Por consiguiente, el procedimiento de cribado desvelado en este documento incluye un procedimiento para buscar una sustancia que reduce la cantidad de expresión de CD81 (una sustancia que devuelve el nivel de expresión al nivel normal) usando el nivel de expresión de proteínas de CD81 como índice. Por este procedimiento de cribado puede proporcionarse la sustancia candidata que tiene una actividad de alivio/inhibitoria de EII (que presenta un efecto de mejoría/tratamiento contra EII).

Es decir, el procedimiento de cribado desvelado en este documento es para proporcionar una sustancia candidata que convierte un principio activo de un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) buscando una sustancia que reduce la cantidad de expresión de la proteína de CD81.

En el caso de usar específicamente células que expresan y que producen CD81, la selección de la sustancia candidata puede realizarse usando como índice el hecho de que la cantidad (nivel) de proteína de CD81 en células que contienen la sustancia de prueba (sustancia candidata) se reduce en comparación con la cantidad (nivel) de proteína en células que no contienen la sustancia de prueba (sustancia candidata). En el caso de usar células que requieren la sustancia inductora de la expresión en la expresión y la producción de CD81, la selección puede realizarse usando como índice el hecho de que la producción de la proteína inducida por una sustancia inductora de la expresión [por ejemplo, lipopolisacárido (LPS), ésteres de forbol (PMA y similares), ionóforo de calcio y citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , IFN γ y similares)] es inhibida por la presencia de la sustancia de prueba, es decir, la expresión del gen CD81 de las células puestas en contacto con la sustancia de prueba en presencia de la sustancia inductora de la expresión se reduce en comparación con las células de control (control más) no puestas en contacto con la sustancia de prueba en presencia de la sustancia inductora de la expresión.

La cantidad de producción de CD81 en este procedimiento de cribado desvelado en este documento puede determinarse mediante un procedimiento conocido tal como el procedimiento de transferencia Western usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo que reconoce una proteína de CD81 humano o su homólogo), tal como el marcador de enfermedad descrito en este documento. El procedimiento de transferencia Western puede realizarse usando el marcador de enfermedad como un anticuerpo primario, y luego marcando con un anticuerpo que puede unirse al anticuerpo primario y marcarse con un radioisótopo tal como ¹²⁵I, una sustancia fluorescente o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpo secundario, y medir señales derivadas de estas sustancias de marcado con un detector de radiación (BAS-1800II: fabricado por Fuji Photo Film., Inc., etc.), un detector de fluorescencia o similares. Además, también es posible que después de usar el marcador de enfermedad como anticuerpo primario la detección se realice con el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según su protocolo y la medición se lleve a cabo con un Multi Bio Imager STORM860 (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech).

La sustancia de prueba (sustancia candidata) que va a cribarse mediante el procedimiento de cribado desvelado en

este documento no está limitada. Incluye un ácido nucleico (incluyendo un polinucleótido antisentido del gen CD81), un péptido, una proteína, un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y similares. El cribado se realiza específicamente poniendo en contacto estas sustancias de prueba o muestras (muestras de prueba) que contienen las mismas con las células anteriores o fracciones de membrana celular. Ejemplos de las muestras de prueba incluyen un extracto de células, un producto de expresión de una biblioteca de genes, un compuesto sintético de bajo peso molecular, un péptido sintético, un compuesto natural y similares que contienen la sustancia de prueba. Sin embargo, éstos no son críticos.

(1-3) Procedimiento de cribado usando una función (actividad) de una proteína

En el presente documento se desvela un procedimiento para cribar una sustancia que inhibe una función (actividad) de CD81.

El procedimiento de cribado comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) una etapa de poner en contacto una sustancia de prueba con CD81,
- (b) una etapa de medir la función (actividad) de CD81 producida por la etapa en (a) anterior, y comparar la función (actividad) con la función (actividad) de CD81 no puesta en contacto con la sustancia de prueba, y
- (c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que inhibe la función (actividad) de CD81 basándose en los resultados de comparación en (b).

En el procedimiento de cribado desvelado en este documento puede usarse cualquier procedimiento para medir la función-actividad basándose en una función-actividad conocida de CD81. Es decir, un procedimiento de cribado en el que una sustancia de prueba se añade a un sistema de medición de función-actividad de CD81 y una sustancia de prueba que inhibe la función-actividad de CD81 conocida se selecciona como una sustancia candidata que tiene un efecto de mejoría/tratamiento contra las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) que se encuentra bajo la categoría del procedimiento de cribado desvelado en este documento.

El procedimiento de cribado puede realizarse poniendo en contacto células que contienen CD81 o fracciones de células preparadas a partir de las células con la sustancia de prueba.

Las células usadas en el procedimiento de cribado pueden incluir células, tanto endógenas como exógenas, que pueden expresar CD81. Como células pueden usarse específicamente las células mostradas en (1-1) antes y similares. Las fracciones de células significan diversas fracciones derivadas de las células. Ejemplos de las mismas incluyen fracciones de la membrana celular, fracciones de citoplasma, fracciones de núcleo de células y similares.

El CD81 usado en el cribado es una proteína conocida y puede obtenerse mediante procedimientos, concretamente clonación de ADN, construcción de cada plásmido, transfección en un huésped, incubación de una célula transformante y, según se requiera, recuperación de la proteína de un cultivo. Estos procedimientos pueden realizarse según un procedimiento conocido para un experto o un procedimiento descrito en los documentos [Molecular Cloning, T. Maniatis y col., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)] y similares.

Específicamente, la proteína de CD81 puede obtenerse produciendo un ADN recombinante (vector de expresión) que puede expresar un gen que codifica CD81 en una célula huésped deseada, introduciendo este ADN en una célula huésped para la transformación, incubación del transformante y recuperación de la proteína deseada del cultivo resultante.

Como se mostrará en los ejemplos, la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en células patógenas para la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para EII, y el anticuerpo anti-CD81 presenta el efecto terapéutico en animales del modelo de EII. A partir de este hallazgo, el aumento en la función (actividad) de CD81 se considera que está relacionado con las enfermedades inflamatorias del intestino (EII). Por consiguiente, el procedimiento de cribado desvelado en este documento incluye un procedimiento para buscar una sustancia que inhibe una función (actividad) de CD81 usando la función (actividad) de CD81 como índice. Según el procedimiento de cribado, la sustancia que inhibe la función (actividad) de CD81 puede buscarse y, por tanto, se proporciona la sustancia candidata que tiene la actividad de alivio/inhibitoria de las enfermedades inflamatorias del intestino (que presentan el efecto de mejoría/tratamiento contra EII).

Es decir, el procedimiento de cribado desvelado en este documento es para proporcionar la sustancia candidata que se vuelve un principio activo del agente para prevenir, mejorar o tratar enfermedades inflamatorias del intestino (EII) buscando la sustancia que inhibe la función (actividad) de CD81.

Con respecto a la selección de la sustancia candidata, la búsqueda de la sustancia que inhibe (reduce) la función (actividad) de la proteína de CD81 puede realizarse específicamente usando como índice el hecho de que la función (actividad) de la proteína obtenida cuando se pone en contacto las células que contienen CD81 o las fracciones de células preparadas a partir de las células con la sustancia de prueba se reduce en comparación con la función

(actividad) de la proteína de las células de control sin sustancia de prueba o las fracciones de células.

La sustancia de prueba (sustancia candidata) que va a cribarse por el procedimiento de cribado desvelado en este documento no está limitada. Ejemplos de la misma incluyen un ácido nucleico, un péptido, una proteína (incluyendo un anticuerpo anti-CD81), un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico y similares. El cribado desvelado en este documento se realiza específicamente poniendo en contacto estas sustancias de prueba o muestras (muestras de prueba) que contienen la misma con la disolución acuosa, las células o las fracciones de células. Ejemplos de las muestras de prueba incluyen un extracto de células, un producto de expresión de una biblioteca de genes, un compuesto sintético de bajo peso molecular, un péptido sintético, un compuesto natural y similares que contienen la sustancia de prueba. Sin embargo, éstos no son críticos.

Ejemplos específicos del procedimiento de cribado desvelado en este documento basado en la función (actividad) de CD81 son del siguiente modo.

(A) Cribado usando una actividad para inhibir la unión como índice 1

CD81 es una molécula de la superficie celular, y una fibronectina es conocida como su sustancia de unión. Por consiguiente, basándose en esta cualidad conocida puede realizarse el cribado de una sustancia de prueba (sustancia candidata) que cambia la función (actividad) de CD81. Es decir, puede realizarse usando la unión entre CD81 como proteína y una sustancia que está unida a CD81, tal como fibronectina (denominada algunas veces en lo sucesivo una "sustancia de unión a CD81"), como índice. En este caso, una sustancia de prueba que inhibe la unión entre la proteína de CD81 y la sustancia de unión a CD81 puede seleccionarse como una sustancia candidata.

Es decir, el procedimiento de cribado desvelado en este documento basado en la actividad para inhibir la unión incluye un procedimiento que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de poner en contacto CD81 con una sustancia de unión a CD81 en presencia de una sustancia de prueba,

(b) una etapa de medir una cantidad de unión obtenida mediante la reacción y comparar la cantidad de unión con una cantidad de unión (cantidad de unión de control) obtenida realizando la etapa (a) en ausencia de la sustancia de prueba, y

(c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que cambia la cantidad de unión en comparación con la cantidad de unión de control basándose en los resultados en (b).

En este caso, ejemplos de la inhibición o el aumento de la unión entre la sustancia de unión y CD81 incluyen (i) la inhibición o el aumento de la unión entre CD81 y la sustancia de unión uniéndose a la sustancia de unión y (ii) la inhibición o el aumento de la unión entre CD81 y la sustancia de unión uniéndose a CD81. Sin embargo, no está particularmente limitado mientras que la unión sea inhibida o aumentada.

(B) Cribado usando una actividad para inhibir la unión como índice 2

CD81 también se llama TAPA-1. Tiene una función de diferenciación, proliferación, activación o unión de linfocitos, y la integrina participa en su expresión fisiológicamente y funcionalmente. En estudios usando un anticuerpo anti-CD81 se ha informado que la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) se activa en linfocitos B o aumenta la producción de IL-4 a partir de linfocitos T presentadores de antígeno en linfocitos B. Como la integrina $\alpha 4\beta 1$ está unida a una fibronectina del sustrato extracelular, CD81 insta a que los linfocitos B se unan a fibronectina de linfocitos B [Behr S y col. J. Exp Med 182:1191-1199 (1995)].

Por consiguiente, la sustancia inhibitoria o la sustancia candidata para inhibir la función (actividad) de CD81 puede cribarse midiendo la actividad de unión a fibronectina de linfocitos B dependientes de integrina $\alpha 4\beta 1$ que es una propiedad conocida de CD81. En este caso, la sustancia candidata puede seleccionarse específicamente, por ejemplo, cuando la actividad de unión a fibronectina de linfocitos B proporcionada poniendo en contacto el anticuerpo anti-CD81 en presencia de la sustancia de prueba (sustancia candidata) se reduce (inhibe) en comparación con la actividad de unión a fibronectina de linfocitos B proporcionada poniendo en contacto el anticuerpo anti-CD81 en ausencia de la sustancia de prueba (sustancia candidata).

Es decir, el procedimiento de cribado basado en la actividad de unión a célula de CD81 incluye un procedimiento que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de poner en contacto células de expresión de CD81 con un anticuerpo anti-CD81 en presencia de una sustancia de prueba,

(b) una etapa de medir una actividad de unión a fibronectina de linfocitos B en (a) y comparar el valor de la actividad de unión con un valor de actividad de unión a fibronectina (valor de actividad de control) obtenido poniendo en contacto las células con el anticuerpo anti-CD81 en ausencia de la sustancia de prueba, y

(c) una etapa de seleccionar la sustancia de prueba que reduce el valor de actividad en comparación con el valor de actividad de control basándose en los resultados en (b).

Los procedimientos de cribado en (A) y (B) que son los procedimientos de cribado basados en la función (actividad) de CD81 pueden realizarse usando células que expresan CD81 o fracciones de células de las mismas. Ejemplos específicos de las células que expresan CD81 incluyen las células mostradas en (1-1) antes, células en las que CD81 se expresa en la naturaleza, células transformantes formadas introduciendo el gen que codifica CD81 en células y similares. Las células de expresión de CD81 usadas en el procedimiento de cribado en (B) pueden ser linfocitos B.

Si se usan membranas celulares de las células de expresión de CD81, por ejemplo, un tampón hipotónico se añade a las células, y las células se perturban hipotómicamente, seguido de homogeneización. La centrifugación se realiza para obtener un precipitado de una fracción de membrana celular. Se sospecha que este precipitado en un tampón puede obtener una fracción de membrana celular que contiene un receptor. La fracción de membrana celular resultante puede purificarse de una manera usual por una columna que tiene un anticuerpo unido a la misma o similares.

Las células transformantes pueden prepararse mediante un procedimiento conocido para un experto según un documento básico tal como *Molecular Cloning 2ª ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Por ejemplo, un ADNc de CD81 se inserta en un vector de expresión conocido tal como pCAGGS [Gene 108, 193-199 (1991)], derivados de pADNc1.1 o pADNc3.1 (Invitrogen). Entonces, el vector resultante se introduce en un huésped apropiado, y el transformante se incuba para poder producir una célula transformante en la que se ha expresado la proteína correspondiente al ADN de CD81 introducido. Como huésped pueden usarse célula CHO, célula C127, célula BHK21, célula COS y similares que son generalmente generalizadas. Sin embargo, éstas no son críticas, y también están disponibles levaduras, bacterias, células de insecto y similares.

Como procedimiento para introducir el vector de expresión que tiene el z ADNc de CD81 en la célula huésped está disponible cualquier procedimiento conocido para la introducción de un vector de expresión en una célula huésped. Ejemplos de los mismos incluyen un procedimiento de fosfato de calcio [J. Virol., 52, 456-467 (1973)], un procedimiento usando LT-1 (fabricado por Panvera), un procedimiento usando lípidos de introducción en genes (lipofectamina y lipofectina; fabricados por Gibco-BRL) y similares.

La proteína puede usarse como tal o marcarse con una sustancia de marcado arbitraria. Ejemplos de la sustancia de marcado aquí pueden incluir radioisótopos (^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I y similares), sustancias fluorescentes (kits de marcado de proteínas Alexa de Molecular Probes y similares), sustancias quimioluminiscentes (kit de marcado por quimioluminiscencia de Assay Designs), biotina (kits de biotinilación EZ-Link de Pierce y similares), proteínas marcadoras, marcas de péptidos y similares. Ejemplos de las proteínas marcadoras pueden incluir proteínas marcadoras conocidas tales como fosfatasa alcalina (Cell, 63, 185-194, 1990), una región Fc de un anticuerpo (número de acceso de GenBank M87789) y HRP (peroxidasa de rábano picante) y similares. Ejemplos de marcas de péptido pueden incluir marcas de péptido conocidas tales como la marca Myc, la marca His y la marca FLAG.

El anticuerpo anti-CD81 puede obtenerse comprando un anticuerpo anti-CD81 comercial (fabricado por Pharmingen).

La actividad de unión a fibronectina puede medirse fácilmente con referencia a J Exp Med, 1995, 182: 1191-1199.

La sustancia de prueba que se obtiene selectivamente de este modo es un potente candidato de un agente para aliviar o inhibir (prevenir, mejorar o tratar) las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

La sustancia candidata seleccionada por el procedimiento de cribado desvelado en este documento como se describe en (1-1) a (1-3) antes puede someterse adicionalmente a una prueba farmacéutica y una prueba de seguridad usando animales del modelo de EII tales como (1) un modelo de EII de afectación espontáneo (ratón C3H/HeJBir, tamarinos de cabeza de algodón o similares), (2) un modelo inducido por sustancias químicas [modelo inducido por dinitroclorobenceno (rata), un modelo de ácido acético (rata), un modelo inducido por ácido trinitrobenzenosulfónico (ratón, rata o conejo), un modelo inducido por sulfato de dextrano (ratón, rata o hámster), un modelo inducido por carragenina (rata o cobaya), un modelo inducido por indometacina (rata) o similares, (3) un animal transgénico o mutante (ratón de genes inactivados para IL-2, ratón de genes inactivados para IL-10, ratón de genes inactivados para TCR o similares) y (4) un modelo de transferencia de células (ratón SCID transferido con CD45RBhi o similares) y un ensayo clínico para pacientes con EII. Un agente de mejoría o de tratamiento de EII más práctico puede obtenerse realizando estas pruebas. La sustancia así seleccionada puede producirse adicionalmente industrialmente por síntesis química, síntesis biológica (fermentación) o manipulación génica basándose en los resultados de su análisis estructural.

Todos los modelos animales anteriores son conocidos para un experto, y pueden usarse modelos animales descritos en, por ejemplo, "In vivo models of Inflammation" compilados por D. W. Morgans (1999, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland). Específicamente, el modelo de EII de afectación espontáneo (ratón C3H/HeJBir, tamarinos de cabeza de algodón o similares) puede producirse mediante el procedimiento descrito en Gastroenterology, vol. 107, pág. 1726-1735 (1994) o similares. El modelo inducido por sustancia química (se usa ácido 2,4,6-nitrobenzenosulfónico o similares) puede producirse mediante el procedimiento descrito en Gastroenterology, vol.

96, pág. 795-803 (1989) o similares.

Los procedimientos de cribado descritos en (1-1) a (1-3) antes pueden usarse no sólo para seleccionar la sustancia candidata del agente para mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), sino también para estimar y confirmar si el agente para prevenir o tratar EII disminuye o no la expresión del gen CD81 o si inhibe o no la expresión o la función-actividad de CD81. Es decir, el ámbito del procedimiento de cribado de la invención incluye no sólo un procedimiento para buscar la sustancia candidata, sino también un procedimiento para tal estimación o confirmación.

(2) Agente para mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII)

(2-1) Anticuerpo anti-CD81 que va a usarse según la invención

La invención proporciona un anticuerpo anti-CD81 eficaz para prevenir, mejorar o tratar EII. El anticuerpo anti-CD81 usado en la invención no está particularmente limitado, mientras que presente un efecto para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

El anticuerpo anti-CD81 usado en la invención puede obtenerse como anticuerpo policlonal o monoclonal mediante un procedimiento conocido. Como anticuerpo anti-CD81 usado en la presente invención se prefiere uno monoclonal de, en particular, de origen mamífero. El anticuerpo monoclonal de mamífero incluye un anticuerpo producido por un hibridoma y un anticuerpo producido por un huésped transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos genéticamente manipulados. Este anticuerpo, mediante la unión a CD81, elimina células de expresión de CD81, y así bloquea o activa la transmisión de una actividad biológica de CD81 en células.

El hibridoma que produce un anticuerpo anti-CD81 puede producirse usando básicamente una técnica conocida descrita más adelante. Es decir, puede producirse usando CD81 como un antígeno de sensibilización, inmunizándolo por un procedimiento de inmunización usual, fusionando las células inmunitarias resultantes con células parentales conocidas por un procedimiento de fusión de células usual y cribando células productoras de anticuerpos monoclonales por un procedimiento de cribado usual.

Específicamente, el anticuerpo anti-CD81 puede producirse del siguiente modo. Por ejemplo, el CD81 humano usado como antígeno de sensibilización para obtener un anticuerpo se forma mediante un procedimiento conocido.

Es aconsejable que la secuencia de genes de CD81 se inserte en un sistema de vector de expresión conocido para transformar una célula huésped apropiada y CD81 de la superficie de la célula huésped se usa como antígeno de sensibilización. Como antígeno de sensibilización pueden usarse células de expresión de CD81, por ejemplo, todas las células linfáticas.

Aunque los mamíferos que van a inmunizarse con el antígeno de sensibilización no están específicamente limitados, se seleccionan preferentemente considerando su compatibilidad con la célula parental para uso en fusión de células. Generalmente incluyen, pero no se limitan a, roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y similares.

La inmunización de animales con un antígeno de sensibilización se lleva a cabo usando un procedimiento conocido. Un procedimiento general, por ejemplo, implica la administración intraperitoneal o subcutánea de un antígeno de sensibilización al mamífero. Específicamente, un antígeno de sensibilización que se ha diluido y suspendido en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica, etc., se mezcla, según se desee, con una cantidad apropiada de un adyuvante común, por ejemplo, adyuvante completo de Freund. Después de emulsionarse se administra preferentemente a un mamífero durante varias veces cada 4 a 21 días. Alternativamente puede usarse un vehículo adecuado en el momento de la inmunización del antígeno de sensibilización.

Después de la inmunización y la confirmación del aumento en los niveles de anticuerpos deseados en el suero, las células inmunitarias se extraen del mamífero y se someten a fusión de células, incluyendo las células inmunitarias preferidas en particular las células del bazo.

Las células de mieloma de mamífero como las otras células parentales que se someten a fusión de células con las células inmunitarias anteriormente mencionadas incluyen preferentemente diversas líneas celulares conocidas tales como P3X63AgB.653 (Kearney, J.F. y col., J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. y col., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. y col., Nature (1978) 276: 269-270), FO (de St. Groth, S. F. y col., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210 (Galfre, G. y col., Nature (1979) 277: 131-133) y similares.

La fusión de células entre las células inmunitarias anteriores y las células de mieloma puede realizarse esencialmente según un procedimiento conocido tal como se describe en Milstein y col. (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) y similares.

Más específicamente, la anterior fusión de células se lleva a cabo en el caldo nutritivo convencional en presencia de, por ejemplo, un acelerador de la fusión de células. Como acelerador de la fusión de células puede usarse, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares y además puede añadirse un adyuvante tal como dimetilsulfóxido, etc., según se desee para potenciar la eficiencia de la fusión.

La relación preferida de células inmunitarias y células de mieloma que va a usarse es, por ejemplo, 1 a 10 veces más células inmunitarias que células de mieloma. Ejemplos de medios de cultivo que van a usarse para la anterior fusión de células incluyen medio RPMI1640 y medio de cultivo MEM adecuado para el crecimiento de las líneas de células de mieloma anteriores, y el medio de cultivo convencional usado para este tipo de cultivo celular, y además puede añadirse un complemento de suero tal como suero bovino fetal (SBF).

En la fusión de células, cantidades predeterminadas de las anteriores células inmunitarias y las células de mieloma se mezclan bien en el líquido de cultivo anterior al que se añade una disolución de PEG previamente calentada a aproximadamente 37°C, por ejemplo una disolución de PEG con un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000, a una concentración del 30 al 60% (peso/volumen) y se mezcla para obtener las células de fusión deseadas (hibridomas). Entonces, repitiendo la adición secuencial de un líquido de cultivo adecuado y centrifugación para eliminar el sobrenadante pueden eliminarse agentes de fusión de células etc., que no son deseables para el crecimiento del hibridoma.

Dicho hibridoma se selecciona cultivando en el medio de selección convencional, por ejemplo, el medio de cultivo HAT (un líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en dicho medio de cultivo HAT continúa generalmente durante un periodo de tiempo suficiente para efectuar la destrucción de las células distintas del hibridoma deseado (células de no fusión), generalmente varios días a varias semanas. Se realiza el procedimiento de dilución limitante convencional, en el que los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se criban y se clonan monoclonalmente.

Además de obtenerse el hibridoma anterior inmunizando un animal distinto del ser humano con un antígeno, también es posible sensibilizar linfocitos humanos *in vitro* con antígeno deseado o células presentadoras de antígeno deseadas, y los linfocitos B sensibilizados resultantes se fusionan con una célula de mieloma humana, por ejemplo, U266, para obtener el anticuerpo humano deseado que tiene la actividad para unirse al antígeno deseado o células presentadoras de antígeno deseadas (véase la publicación de patente japonesa posteriormente examinada (Kokoku) nº 1(1989)-59878). Además, un animal transgénico que tiene un repertorio de todos los genes de anticuerpos humanos se inmuniza con el antígeno o las células presentadoras de antígeno para obtener el anticuerpo humano deseado en el procedimiento descrito anteriormente (véase la solicitud de patente internacional WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales así contruidos pueden subcultivarse en el líquido de cultivo convencional, o pueden almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado en nitrógeno líquido.

Con el fin de obtener anticuerpos monoclonales a partir de dicho hibridoma puede mencionarse un procedimiento en el que dicho hibridoma se cultiva en el procedimiento convencional y los anticuerpos se obtienen como sobrenadante, o un procedimiento en el que el hibridoma se administra a y se cultiva en un mamífero compatible con dicho hibridoma y los anticuerpos se obtienen como ascitis. El primer procedimiento es adecuado para obtener anticuerpos de alta pureza, mientras que el último es adecuado para una producción de anticuerpos a gran escala.

En la presente invención puede usarse como anticuerpo monoclonal un anticuerpo recombinante que se produjo por tecnología de genes recombinantes en la que un gen de anticuerpo se clonó a partir del hibridoma y se integró en un vector adecuado que luego se introdujo en un huésped (véase, por ejemplo, Borrebaeck C.A.K. y Larrick J,4V., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

Específicamente, el ARNm que codifica la región variable (V) del anticuerpo deseado se aísla del hibridoma que produce el anticuerpo. El aislamiento del ARNm se realiza preparando ARN total usando, por ejemplo, un procedimiento conocido tal como el procedimiento de ultracentrifuga de guanidina (Chirgwin, J.M. y col., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el procedimiento de AGPC (Chomczynski, P. y col., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), y luego el ARNm se purifica a partir del ARN total usando el kit de purificación de ARNm (fabricado por Pharmacia) y similares. Alternativamente, el ARNm puede prepararse directamente usando el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

El ADNc de la región V del anticuerpo puede sintetizarse a partir del ARNm así obtenido usando una transcriptasa inversa. El ADNc puede sintetizarse usando el kit de síntesis de la primera cadena de ADNc con la transcriptasa inversa de AMV y similares. Alternativamente, para la síntesis y la amplificación de ADNc puede usarse el kit 5'-Ampli FINDER RACE (fabricado por Clontech) y el procedimiento de 5'-RACE (Frohman, M.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. y col., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) que emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento de ADN deseado se purifica a partir del producto de PCR obtenido y puede ligarse al vector ADN. Además, un vector recombinante se construye a partir del mismo y

luego se introduce en *E. coli*, etc., de la que se seleccionan colonias para preparar el vector recombinante deseado. La secuencia de bases del ADN deseado puede confirmarse mediante un procedimiento conocido tal como el procedimiento de didesoxi.

5 Una vez ha sido obtenido el ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado puede ligarse a ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, que entonces se integra en un vector de expresión. Alternativamente, el ADN que codifica la región V del anticuerpo puede integrarse en un vector de expresión que ya contiene ADN que codifica la región C del anticuerpo.

10 Con el fin de producir el anticuerpo para uso en la presente invención, el gen del anticuerpo se integra como se describe más adelante en un vector de expresión de manera que se expresa bajo el control de la región reguladora de la expresión, por ejemplo, un potenciador y/o un promotor.

15 Posteriormente, el vector de expresión puede transformarse en una célula huésped y el anticuerpo puede entonces expresarse en ella.

Según la presente invención puede usarse anticuerpo recombinante artificialmente alterado tal como anticuerpo quimérico y anticuerpo humanizado con el fin de reducir la antigenicidad heteróloga contra seres humanos. Este anticuerpo alterado puede producirse usando procedimientos conocidos.

20 El anticuerpo quimérico puede obtenerse ligando el ADN así obtenido que codifica la región V del anticuerpo a ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, que luego se integra en un vector de expresión y se introduce en un huésped para la producción del anticuerpo en él (véase la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 92/19759). Usando este procedimiento conocido puede obtenerse anticuerpo quimérico útil para la presente invención.

25 El anticuerpo humanizado que también se llama anticuerpo humano reestructurado se ha preparado injertando las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de un mamífero distinto de ser humano, por ejemplo, anticuerpo de ratón, en las CDR de un anticuerpo humano. La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos también es conocida (véase la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 92/19759).

30 Específicamente, una secuencia de ADN que se diseñó para ligar la CDR del anticuerpo de ratón con la región estructural (FR) del anticuerpo humano se sintetiza a partir de varios oligonucleótidos divididos que tienen secciones que se solapan entre sí en los extremos por la técnica de PCR. El ADN así obtenido está ligado al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano y luego se integra en un vector de expresión, que se introduce en un huésped para la producción de anticuerpos (véase la solicitud de patente europea EP 239400 y la solicitud de patente internacional WO 92-19759).

35 La FR del anticuerpo humano ligada mediante la CDR se selecciona de manera que la región determinante de la complementariedad pueda formar un sitio de unión a antígeno favorable. Si se desea, los aminoácidos en la región estructural de la región variable del anticuerpo pueden sustituirse de manera que la región determinante de la complementariedad del anticuerpo humano reestructurado pueda formar un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. y col., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

40 Para anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado se usa la región C del anticuerpo humano. Como región C del anticuerpo humano puede mencionarse $C\gamma$, y pueden usarse, por ejemplo, $C\gamma 1$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$ o $C\gamma 4$. La región C del anticuerpo humano puede modificarse para mejorar la estabilidad del anticuerpo o la producción de los mismos.

45 El anticuerpo quimérico consiste en la región variable del anticuerpo derivada de un mamífero distinto de ser humano y la región C derivada del anticuerpo humano, mientras que el anticuerpo humanizado consiste en la región determinante de la complementariedad del anticuerpo derivada de un mamífero distinto de ser humano y la región estructural (FR) y la región C del anticuerpo derivada de anticuerpo humano. Por consiguiente, la antigenicidad de los mismos en el cuerpo humano se ha reducido de manera que son útiles como principio activo de los agentes terapéuticos de la presente invención.

50 Los genes de anticuerpos construidos como se ha descrito anteriormente pueden expresarse y obtenerse en un procedimiento conocido. En el caso de células de mamífero, la expresión puede llevarse a cabo usando un ADN en el que un promotor útil comúnmente usado, el gen del anticuerpo que va a expresarse y la señal polyA en la dirección 3' del mismo se han ligado operativamente o un vector que contiene dicho ADN. Ejemplos del promotor/potenciador incluyen promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano.

55 Adicionalmente, como promotor/potenciador que puede usarse para la expresión del anticuerpo para uso en la presente invención hay promotores/potenciadores víricos tales como retrovirus, virus del polioma, adenovirus y virus simio 40 (SV40), y promotores/potenciadores derivados de células de mamífero tales como el factor de extensión humano 1α (HEF1 α).

Por ejemplo, la expresión puede realizarse fácilmente mediante el procedimiento de Mulligan y col. (Nature (1979) 277, 108) cuando se usa el promotor/potenciador del SV40, o mediante el procedimiento de Mizushima y col. (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) cuando se usa el promotor/potenciador de HEF1 α .

5 En el caso de *E. coli*, la expresión puede realizarse ligando operativamente un promotor útil comúnmente usado, una secuencia señal para la secreción de anticuerpos y el gen del anticuerpo que va a expresarse, seguido de la expresión del mismo. Como promotor puede mencionarse, por ejemplo, el promotor lacZ y el promotor araB. El procedimiento de Ward y col. (Nature (1989) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) puede usarse cuando se usa el promotor lacZ, y el procedimiento de Better y col. (Science (1988) 240, 1041-1043) puede usarse cuando se

10 usa el promotor araB.

Como secuencia señal para la secreción de anticuerpos, cuando se produce en el periplasma de *E. coli*, puede usarse la secuencia señal de pelB (Lei, S. P. y col., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379). Después de separarse el anticuerpo producido en el periplasma, la estructura del anticuerpo se repliega apropiadamente antes de uso (véase, por ejemplo, el documento WO 96/30394).

15

Como origen de replicación pueden usarse aquellos derivados de SV40, virus del poliovirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (VPB) y similares. Además, para la amplificación del número de copias de genes en el sistema de células huésped, los vectores de expresión pueden incluir como marcadores de selección el gen aminoglucósido-fosfotransferasa (APH), el gen timidina-cinasa (TK), el gen xantina-guaninafosforribosil-transferasa de *E. coli* (Ecogpt), el gen dihidrofolato-reductasa (dhfr) y similares.

20

Para la producción del anticuerpo para uso en la presente invención puede usarse cualquier sistema de producción. El sistema de producción de la preparación de anticuerpos comprende el sistema de producción *in vitro* o *in vivo*. Como sistema de producción *in vitro* puede mencionarse un sistema de producción que emplea células eucariotas y el sistema de producción que emplea células procariotas.

25

Si se usan células eucariotas, hay sistemas de producción que emplean células animales, células vegetales y células fúngicas. Células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero tales como células CHO, células COS, células de mieloma, células de riñón de hámster bebé (BHK), células HeLa y células Vero, (2) células de anfibio tales como *Xenopus oocytes*, o (3) células de insecto tales como sf9, sf21, y Tn5. Células vegetales conocidas incluyen, por ejemplo, aquellas derivadas de *Nicotiana tabacum*, que se somete a cultivo de callo. Células fúngicas conocidas incluyen levaduras tales como el género *Saccharomyces*, más específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, u hongos filamentosos tales como el género *Aspergillus*, más específicamente *Aspergillus niger*.

30

Si se usan células procariotas, hay sistemas de producción que emplean células bacterianas. Células bacterianas conocidas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis*.

35

El anticuerpo puede obtenerse introduciendo mediante la transformación el gen del anticuerpo deseado en esas células y cultivando las células transformadas *in vitro*. El cultivo se realiza en los procedimientos conocidos. Por ejemplo, como líquido de cultivo puede usarse DMEM, MEM, RPMI1640 e IMDM, y pueden usarse complementos de suero tales como suero bovino fetal (SBF) en combinación. Además, los anticuerpos pueden producirse *in vivo* implantando células en las que el gen del anticuerpo se ha introducido en la cavidad abdominal de un animal y similares.

40

Como sistemas de producción *in vivo* pueden mencionarse aquellos que emplean animales y aquellos que emplean plantas. Si se usan animales, hay sistemas de producción que emplean mamíferos e insectos.

45

Como mamíferos pueden usarse cabras, cerdos, oveja, ratones y ganado (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Por tanto, como insectos pueden usarse gusanos de seda.

50

Si se usan plantas puede usarse, por ejemplo, tabaco.

Los genes de anticuerpos se introducen en estos animales o plantas, y los anticuerpos se producen en tales animales o plantas, y se recuperan. Por ejemplo, un gen del anticuerpo se inserta en el centro del gen que codifica proteína que se produce inherentemente en la leche tal como β -caseína de cabra para preparar genes de fusión. Los fragmentos de ADN que contienen el gen de fusión en el que se ha insertado el gen del anticuerpo se inyectan en un embrión de cabra, y el embrión se introduce en una cabra hembra. El anticuerpo deseado se obtiene a partir de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o cría de la misma. Con el fin de aumentar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica pueden administrarse hormonas a la cabra transgénica según convenga. (Ebert, K.M. y col., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

60

Si se usan gusanos de seda, el baculovirus en el que el gen del anticuerpo deseado se ha insertado se infecta al gusano de seda, y el anticuerpo deseado puede obtenerse a partir del fluido corporal del gusano de seda (Maeda, S. y col., Nature. (1985) 315, 592-594). Además, si se usa tabaco, el gen del anticuerpo deseado se inserta en un

65

vector de expresión para plantas, por ejemplo pMON 530, y entonces el vector se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Entonces, la bacteria infecta al tabaco tal como *Nicotiana tabacum* para obtener el anticuerpo deseado a partir de las hojas del tabaco (Julian, K. -C. Ma y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

5 Si el anticuerpo se produce en sistemas de producción *in vitro* o *in vivo*, como se ha descrito anteriormente, el ADN que codifica la cadena pesada (cadena H) o la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo puede integrarse por separado en un vector de expresión y los huéspedes se transforman simultáneamente, o el ADN que codifica la cadena H y la cadena L puede integrarse en un único vector de expresión y el huésped se transforma con el mismo (véase la solicitud de patente internacional WO 94-11523).

10 Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o versiones modificadas de los mismos siempre que se usen preferentemente. Por ejemplo, como fragmentos de anticuerpo pueden mencionarse Fab, F(ab')₂, Fv o Fv (scFv) monocatenario en el que Fv de la cadena H y la cadena L se ligaron mediante un ligador adecuado. Específicamente, los anticuerpos se tratan con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para producir fragmentos de anticuerpos, o se construyen genes que codifican estos fragmentos de anticuerpos y luego se introducen en un vector de expresión que se expresa en una célula huésped adecuada (véase, por ejemplo, Co, M. S. y col., J. Immunol. (1994) 152, 2968- 2976; Better, M. y Horwitz, A.H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. y Skerra, A. , Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. y col., Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. y col., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

scFv puede obtenerse ligando la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo. En scFv, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L están preferentemente ligadas mediante un ligador, preferentemente un ligador de péptidos (Huston, J.S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. (1988) 85, 5879-5883). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L en scFv pueden derivarse de cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados. Como ligador de péptidos para ligar las regiones V puede usarse cualquier péptido de una cadena que comprende, por ejemplo, 12 - 19 residuos de aminoácidos.

El ADN que codifica scFv puede obtenerse usando ADN que codifica la región V de la cadena H o la cadena H del anticuerpo anterior y ADN que codifica la región V de la cadena L o la cadena L del anticuerpo anterior como molde amplificando la porción del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada entre las secuencias anteriores por la técnica de PCR con el par de cebadores que especifican los dos extremos de la misma, y amplificando adicionalmente la combinación de ADN que codifica la porción del ligador de péptidos y el par de cebadores que define que ambos extremos de dicho ADN están ligados a la cadena H y la cadena L, respectivamente.

Una vez se ha construido el ADN que codifica scFv puede obtenerse un vector de expresión que lo contiene y un huésped transformado con dicho vector de expresión mediante los procedimientos convencionales, y scFv puede obtenerse usando el huésped resultante mediante los procedimientos convencionales.

40 Estos fragmentos de anticuerpos pueden producirse obteniéndose el gen de los mismos de un modo similar al mencionado anteriormente y permitiendo que se exprese en un huésped. "Anticuerpo" como se usa en la reivindicación de la presente solicitud engloba estos fragmentos de anticuerpos.

Como anticuerpos modificados pueden usarse anticuerpos asociados a diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). "Anticuerpo" como se usa en la presente solicitud engloba estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos así obtenidos. Estos procedimientos ya se han establecido en la materia.

Los anticuerpos producidos y expresados como se ha descrito anteriormente pueden separarse del interior o el exterior de la célula huésped y luego pueden purificarse a homogeneidad. La separación y la purificación del anticuerpo para uso en la presente invención pueden llevarse a cabo por cromatografía de afinidad. Como columna usada para tal cromatografía de afinidad puede mencionarse columna de proteína A y columna de proteína G. Ejemplos de los vehículos usados en la columna de proteína A son Hyper D, POROS, Sepharose F. F. y similares. Alternativamente, los procedimientos para la separación y la purificación convencionalmente usados para las proteínas pueden usarse sin ninguna limitación. La separación y la purificación del anticuerpo para uso en la presente invención puede llevarse a cabo combinando, según sea apropiado, cromatografía distinta de la cromatografía de afinidad anteriormente mencionada, filtración, ultrafiltración, precipitación por sales, diálisis y similares. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel y similares. Estas cromatografías pueden aplicarse en HPLC. Alternativamente puede usarse cromatografía en fase inversa.

La concentración de anticuerpo obtenida en 2-1 anterior puede determinarse por la medición de la absorbancia o por el ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) y similares. Por tanto, si se emplea medición de la absorbancia, el anticuerpo para uso en la presente invención o una muestra que contiene el anticuerpo se diluye apropiadamente con PBS (-) y luego se mide la absorbancia a 280 nm, seguido del cálculo usando el coeficiente de adsorción de 1,35 DO a 1 mg/ml. Si se usa el procedimiento de ELISA, la medición se realiza del siguiente modo. Así, 100 ul de

anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana (fabricado por TAGO) diluido a 1 ug/ml en tampón bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, se añade a una placa de 96 pocillos (fabricada por Nunc) y se incuba durante la noche a 4°C para inmovilizar el anticuerpo.

5 Después del bloqueo se añaden 100 ul de cada anticuerpo apropiadamente diluido para uso en la presente invención o una muestra que contiene el anticuerpo, o 100 ul de IgG humana (fabricada por CAPPEL) como patrón, y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado se añaden 100 ul de anticuerpo dirigido
10 contra IgG humana marcada con fosfatasa alcalina diluida 5000 veces (fabricado por BIO SOURCE) y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, la disolución de sustrato se añade y se incuba, seguido de la medición de la absorbancia a 405 nm usando el lector de microplacas modelo 3550 (fabricado por Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo deseado.

15 El anticuerpo anti-CD81 descrito en este documento también puede usarse como una herramienta de cribado para detectar el cambio en la expresión de CD81 descrito en (1) antes o un agente de diagnóstico (marcador de enfermedad) como se describirá posteriormente en (3).

(2-2) Polinucleótido antisentido

20 En este documento se desvela un polinucleótido antisentido que contiene una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia de bases de CD81 o una parte de la misma, y que es eficaz para prevenir, mejorar o tratar EII.

25 Con respecto al polinucleótido antisentido, cualquier polinucleótido antisentido está disponible, siempre y cuando contenga una secuencia de bases complementaria o sustancialmente complementaria a la secuencia de bases del gen CD81 o una parte de la misma y tenga una actividad que pueda inhibir la expresión del gen CD81. Incluye un ARN antisentido, un ADN antisentido y similares.

30 La secuencia de bases sustancialmente complementaria aquí incluye una secuencia de bases que es homóloga a la secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases del gen CD81 aproximadamente el 70% o más, preferentemente aproximadamente el 80% o más, más preferentemente aproximadamente el 90% o más, lo más preferentemente aproximadamente el 95% o más, y similares. Un polinucleótido antisentido es homólogo a una cadena complementaria de una secuencia de bases de una parte que codifica un sitio del extremo N de la secuencia de bases del gen CD81 (por ejemplo, una secuencia de bases próxima a un codón de iniciación) aproximadamente el 70% o más, preferentemente aproximadamente el 80% o más, más preferentemente aproximadamente el 90% o más, lo más preferentemente aproximadamente el 95% o más. Específicamente se menciona un polinucleótido
35 antisentido que tiene una secuencia complementaria o sustancialmente complementaria a una secuencia de bases descrita en SEC ID N° 1 o una parte de la misma, y similares.

40 El polinucleótido antisentido comprende normalmente de 10 a 1.000 bases, preferentemente de 15 a 500 bases, más preferentemente de 16 a 30 bases. Un residuo fosfato de cada nucleótido que constituye el ADN antisentido puede estar sustituido con un residuo fosfato químicamente modificado tal como fosforotioato, fosfonato de metilo o fosforoditionato. Estos polinucleótidos antisentido pueden producirse por un sintetizador de ADN conocido o similares.

45 Un polinucleótido antisentido tal puede hibridarse con un ARN del gen CD81 para inhibir la síntesis o función del ARN o para controlar la expresión del gen CD81 mediante la interacción con el ARN.

50 El polinucleótido antisentido desvelado en este documento es útil para controlar la expresión del gen de proteína descrito en este documento *in vivo* o *in vitro*, y también es útil para tratar enfermedades o similares. Un bucle de horquilla del extremo 5', una repetición de 6 pares de bases del extremo 5', una región de no traducción del extremo 5', un codón de iniciación de la traducción de polipéptidos, una región de código de proteínas, un codón de terminación de la traducción ORF, una región de no traducción del extremo 3', un región palindrómica del extremo 3', un bucle de horquilla del extremo 3' o similares del gen de la proteína pueden seleccionarse como una región deseada preferible. Puede seleccionarse cualquier región en el gen de la proteína. Con respecto a una relación entre
55 un ácido nucleico objetivo y un polinucleótido al menos parcialmente complementario a la región deseada, si el ácido nucleico objetivo puede hibridarse con la región deseada, puede decirse que este ácido nucleico objetivo es "antisentido" al polinucleótido de la región deseada.

60 Ejemplos del polinucleótido antisentido incluyen un polinucleótido que contiene 2-desoxi-D-ribosa, un polinucleótido que contiene D-ribosa, otros tipos de polinucleótidos que son N-glucósidos de una base de purina o pirimidina, otros polímeros que tienen un esqueleto de no nucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico de proteína comercial y un polímero sintético de ácido nucleico específico de secuencia), otros polímeros que contienen un enlace especial (siempre que los polímeros contengan nucleótidos que tienen una secuencia que permita un apareamiento de bases o adhesión de bases encontradas en un ADN o un ARN), y similares. Estos puede ser un ADN bicatenario, un ADN
65 monocatenario, un ARN bicatenario, un ARN monocatenario y un híbrido de ADN:ARN. Además, pueden ser un polinucleótido sin modificar (o un oligonucleótido sin modificar), una sustancia modificada conocida tal como una

sustancia que tiene una marca conocida en el campo en cuestión, una sustancia tapada, una sustancia metilada, una sustancia en la que uno o más nucleótidos naturales se reemplazan por análogos, una sustancia con modificación de nucleósidos intramoleculares tal como una sustancia que tiene un enlace sin carga (por ejemplo, fosfonato de metilo, fosfotriéster, fosforamidoato o carbamato), una sustancia que tiene un enlace cargado o un enlace que contiene azufre (por ejemplo, fosforotioato o fosforoditioato) tal como una sustancia que tiene un grupo de cadena lateral de una proteína (por ejemplo, nucleasa, inhibidor de nucleasa, toxina, anticuerpo, péptido señal o poli-L-lisina) o un azúcar (por ejemplo, monosacárido), una sustancia que contiene un compuesto intercurrente (por ejemplo, acridina o psolareno), una sustancia que contiene un compuesto quelante (por ejemplo, metal, metal radiactivo, boro o metal oxidante), una sustancia que contiene un agente alquilante y una sustancia que tiene un enlace modificado (por ejemplo, un ácido nucleico de tipo α -anómero). El "nucleósido", "nucleótido" y "ácido nucleico" pueden aquí no sólo ser aquellos que contienen las bases purina y pirimidina, sino también aquellos que contienen otras bases heterocíclicas modificadas. Estas sustancias modificadas pueden ser sustancias que contienen purina y pirimidina metilada, purina y pirimidina acilada y otros heterociclos. En el nucleótido modificado y el nucleótido modificado, el resto de azúcar puede modificarse. Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo pueden sustituirse con un halógeno, un grupo alifático o similares, o pueden convertirse en un grupo funcional tal como un éter o una amina. El polinucleótido antisentido desvelado en este documento es un ARN, un ADN o un ácido nucleico modificado (ARN o ADN). Ejemplos específicos del ácido nucleico modificado pueden incluir derivados de azufre de ácido nucleico, derivados de tiofosfato de ácido nucleico, aquellos que tienen una resistencia a la degradación de amidas de polinucleósidos o amidas de oligonucleósidos, y similares.

El polinucleótido antisentido desvelado en este documento puede diseñarse, por ejemplo, del siguiente modo. Es decir, el polinucleótido antisentido en una célula se convierte en más estable, aumenta más la permeabilidad celular del polinucleótido antisentido, aumenta más la afinidad por una cadena sentido diana y se reduce la toxicidad de un polinucleósido antisentido que es tóxico. Un gran número de tales modificaciones se informan en, por ejemplo, Pharm Tech Japan, vol. 8, pág. 247 o 395, 1992, y Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993.

El polinucleótido antisentido desvelado en este documento puede proporcionarse en una forma especial tal como un liposoma o una microesfera o en una forma de adición más adaptada a la terapia génica. Ejemplos de la sustancia usada en esta forma de adición incluyen una sustancia policationica que actúa para neutralizar una carga de una estructura de grupo fosfato tal como polilisina, y una sustancia hidrófoba que potencia la interacción con una membrana celular o aumenta la incorporación de un ácido nucleico, tal como un lípido (por ejemplo, fosfolípido o colesterol). Ejemplos del lípido preferible que va a añadirse incluyen colesterol y sus derivados (por ejemplo, cloroformiato de colesterol y ácido cólico). Éstos pueden añadirse en el extremo 3' o el extremo 5' del ácido nucleico y adherirse mediante una base, un azúcar o un enlace nucleosídico intramolecular. Como otro grupo, un grupo tapado localizado específicamente en el extremo 3' o el extremo 5' del ácido nucleico para inhibir la degradación con una nucleasa tal como exonucleasa o RNasa. Como grupo tapado se mencionan grupos protectores de un grupo hidroxilo que son conocidos en el campo en cuestión tales como polietilenglicol y tetraetilenglicol. Sin embargo, éstos no son críticos. La actividad inhibitoria del polinucleótido antisentido puede medirse por el procedimiento de cribado desvelado en este documento. El polinucleótido antisentido desvelado en este documento puede ser uno bicatenario como se observa anteriormente, siempre y cuando esté unido a un ARN que codifica CD81 para perturbar el ARN o inhibir su función. Es decir, un ARN bicatenario que contiene una parte del ARN que codifica CD81 y un ARN complementario al mismo y similares están incluidos en el polinucleótido antisentido desvelado en este documento.

(2-3) Agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino

En este documento se desvela un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII). En vista de los nuevos hallazgos de que CD81 se expresa altamente en células patógenas para EII y el anticuerpo anti-CD81 presenta el efecto terapéutico en los animales del modelo de EII, la invención se basa en la idea de que la sustancia que inhibe la expresión del gen CD81, la sustancia que reduce la cantidad de expresión o función (actividad) de CD81 y el anticuerpo anti-CD81 son eficaces para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino.

Por consiguiente, el agente para prevenir, mejorar y tratar EII contiene la sustancia que inhibe la expresión del gen CD81, la sustancia que inhibe la expresión o función (actividad) de CD81 o el anticuerpo anti-CD81 como principio activo.

La sustancia que inhibe la expresión del gen CD81 o la sustancia que inhibe la expresión o función (actividad) de CD81 como principio activo puede ser no sólo una sustancia que se selecciona por el procedimiento de cribado anterior, sino también una sustancia que se produce industrialmente por un procedimiento recomendado basándose en una información de una sustancia seleccionada. Además, puede someterse a una prueba farmacéutica y a una prueba de seguridad usando animales del modelo de EII, y a una prueba clínica para pacientes afectados con EII. Un agente más práctico para mejorar o tratar EII puede obtenerse realizando estas pruebas. La sustancia así seleccionada puede producirse industrialmente basándose en los resultados de su análisis estructural, por síntesis química, síntesis biológica (fermentación) o manipulación génica.

La sustancia que inhibe la expresión del gen CD81 o la sustancia que reduce la cantidad de expresión o función (actividad) de CD81 puede usarse como tal o prepararse como una composición médica mezclándose con vehículos farmacéuticamente aceptables (incluyendo un excipiente, un diluyente, un aglutinante, un lubricante y similares) que son conocidos por sí mismos o aditivos comunes. La composición médica puede administrarse por vía oral o parenteralmente según las formas farmacéuticas (agentes de administración orales tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos y jarabe; agentes de administración parenteral tales como disoluciones para inyección, gotas, preparaciones externas y supositorios) y similares. La dosis varía dependiendo del tipo de principio activo, la vía de administración, la edad, el peso y la afección del sujeto de administración o pacientes, y similares, y no puede definirse absolutamente. Sin embargo, con respecto a una dosis por día, la composición médica puede administrarse a una dosis de normalmente de varios miligramos a 2 g, preferentemente varias décimas de miligramos tanto de una vez como en varias porciones divididas al día.

Un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino que contiene un anticuerpo anti-CD81 que tiene una actividad para inhibir la función (actividad) de la proteína de CD81 como principio activo se incluye en este documento.

Con respecto al agente que contiene el anticuerpo anti-CD81 como principio activo son posibles tanto la administración por vía oral como la administración parenteral. La administración parenteral es preferible. Ejemplos específicos de la misma incluyen una forma farmacéutica en disolución para inyección, una forma farmacéutica transnasal, una forma farmacéutica transpulmonar, una forma farmacéutica percutánea y similares. Con respecto a ejemplos de la forma farmacéutica en disolución para inyección, la administración sistémica o local puede realizarse mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

El agente que contiene el anticuerpo anti-CD81 como principio activo se administra por sí mismo como agente formulado por un procedimiento farmacéutico de fabricación conocido. Por ejemplo, puede usarse en forma de una disolución para inyección de una disolución o suspensión estéril con agua u otros líquidos farmacéuticamente aceptables. Además, se considera que va a formularse mezclándose apropiadamente con vehículos o medios farmacológicamente aceptables tales como agua estéril, una solución salina fisiológica, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizador, un vehículo y un conservante en la forma farmacéutica unitaria requerida para la formulación, que es generalmente autorizada. La cantidad del principio activo en estas preparaciones farmacéuticas se ajusta de forma que se obtenga un volumen apropiado en el intervalo recomendado.

La composición estéril para inyección puede formarse según formulación común usando un vehículo tal como agua destilada para inyección. Ejemplos de la disolución acuosa para inyección incluyen una solución salina fisiológica y disoluciones isotónicas que contienen glucosa y otros auxiliares tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico. Un solubilizante apropiado, por ejemplo, un alcohol tal como etanol, polialcohol tal como propilenglicol o polietilenglicol, un tensioactivo no iónico tal como polisorbato 80TM o HCO-50 puede usarse en combinación.

Ejemplos de aceite incluyen aceite de sésamo y aceite de soja, y pueden usarse benzoato de bencilo o alcohol bencílico en combinación como un solubilizante. Puede incorporarse un agente de tamponamiento tal como un tampón fosfato o un tampón acetato sódico, un agente calmante tal como clorhidrato de procaina, un estabilizador tal como alcohol bencílico, fenol y un antioxidante. La disolución para inyección así formada se envasa normalmente en una ampolla apropiada.

La dosis puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad y la afección de los pacientes. Por ejemplo, la dosis puede seleccionarse en el intervalo de 0,0001 mg a 1.000 mg por kilogramo de peso corporal para una administración. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse en el intervalo de 0,001 a 100.000 mg/cuerpo para un paciente. Sin embargo, el agente terapéutico proporcionado en este documento no está limitado por esta dosis.

En este documento se desvela el agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino que contiene el nucleótido o derivados de nucleótidos para inhibir la expresión de la proteína de CD81 como principio activo. Si la sustancia que inhibe la expresión del gen CD81 o la sustancia que reduce la cantidad de expresión o función (actividad) de CD81 está codificada por un ADN, se considera que el ADN se incorpora en un vector para terapia génica para realizar la terapia génica. Si el principio activo es un nucleótido antisentido contra el gen CD81, la terapia génica puede realizarse usando este nucleótido antisentido como tal o incorporándolo en un vector. Además, en estos casos, la dosis y el procedimiento de administración de la composición para terapia génica varían dependiendo del peso, la edad y la afección de los pacientes y similares, y puede ser seleccionada adecuadamente por un experto.

La terapia génica usando el polinucleótido antisentido se describe en detalle más adelante. La terapia génica puede realizarse, como este tipo de terapia génica común, mediante un procedimiento en el que un oligonucleótido antisentido o su sustancia químicamente modificada se administra directamente al cuerpo de un paciente para controlar la expresión del gen objetivo o un procedimiento en el que el ARN antisentido se introduce en una célula diana de un paciente para inhibir la expresión del gen objetivo por la célula.

El polinucleótido antisentido o su sustancia químicamente modificada pueden unirse a un ARNm de cadena codificante en la célula para inhibir la expresión del gen objetivo, concretamente la expresión de CD81 y, por tanto, inhibir la función (actividad) de CD81.

5 En un procedimiento en el que el polinucleótido antisentido o su sustancia químicamente modificada se administra directamente a un cuerpo vivo es aconsejable que el polinucleótido antisentido o su sustancia químicamente modificada que van a usarse tenga una longitud de preferentemente 10 a 1.000 bases, más preferentemente de 15 a 500 bases, lo más preferentemente de 16 a 30 bases. En la administración, el oligonucleótido antisentido o su sustancia químicamente modificada pueden formularse usando un estabilizador, una disolución tampón, un disolvente y similares que son comúnmente usados.

10 En el procedimiento para introducir el ARN antisentido en una célula diana de un paciente es aconsejable que el ARN antisentido que va a usarse tenga una longitud de preferentemente 10 a 1.000 bases, más preferentemente de 15 a 500 bases, lo más preferentemente de 16 a 30 bases. Además, este procedimiento incluye un procedimiento *in vivo* en el que el gen antisentido se introduce en una célula en un cuerpo vivo y un procedimiento *ex vivo* en el que el gen antisentido se introduce en una célula una vez extraída del cuerpo y la misma célula se devuelve al cuerpo (se refiere a Nikkei Science, abril de 1994, pág. 20-45, Gekkan Yakuji, 36 (1), 23-48 (1994), Jikken Igaku Zokan, 12(15), todas las páginas (1994), y similares). De estos, el procedimiento *in vivo* es preferible e incluye un procedimiento de introducción vírica (procedimiento usando un virus recombinante) y un procedimiento de introducción no vírica (se refiere a los documentos anteriores).

15 El procedimiento usando el virus recombinante incluye procedimientos en los que el polinucleótido antisentido desvelado en este documento se introduce en un cuerpo vivo incorporándolo en genomas de virus de un retrovirus, asociado a lentivirus, un adenovirus, un virus del herpes, un virus Sendai, un virus de la variolovacuna, un virus de la poliomielitis y un virus sindbis. De estos, los procedimientos usando un retrovirus, un adenovirus, un virus adenoasociado y similares son especialmente preferibles. Ejemplos del procedimiento de introducción no vírica incluyen un procedimiento de liposoma, un procedimiento con lipofectina y similares, y un procedimiento de liposoma es especialmente preferible. Otros ejemplos del procedimiento de introducción no vírica incluyen un procedimiento de microinyección, un procedimiento de fosfato de calcio, un procedimiento de electroporación y similares.

20 La composición farmacéutica para terapia génica contiene como principio activo el polinucleótido antisentido anterior o su sustancia químicamente modificada, el virus recombinante que contienen el mismo, la célula infectada que tiene estos virus introducidos en ella o similares. La forma farmacéutica, la vía de administración y similares en la que la composición se administra a un paciente puede determinarse apropiadamente dependiendo de la enfermedad y el síntoma que va a tratarse, y similares. Por ejemplo, puede administrarse intravenosamente, intraarterialmente, subcutáneamente o intramuscularmente en una forma farmacéutica apropiada tal como una disolución para inyección. Además, puede administrarse e introducirse directamente en un sitio de enfermedad deseado de un paciente. Si se emplea el procedimiento *in vivo*, la composición para terapia génica puede proporcionarse en una forma farmacéutica tal como una disolución para inyección que contiene el polinucleótido antisentido desvelado en este documento o una forma farmacéutica en la que un vector de virus que contiene el polinucleótido antisentido está incorporado en un liposoma o un liposoma de fusión de membranas (liposoma del virus Sendai (HVJ) o similares). Estas formas farmacéuticas de liposoma contienen un agente de suspensión, un agente de congelación, un agente de congelación para concentración centrífuga y similares. Además, la composición de terapia génica puede proporcionarse en una forma farmacéutica de una disolución de cultivo celular infectada con el virus que tiene introducido en su interior el vector que contiene el polinucleótido antisentido de la invención. La dosis del principio activo en las preparaciones farmacéuticas de estas formas farmacéuticas puede ajustarse apropiadamente dependiendo del grado de enfermedad que va a tratarse, la edad y el peso de un paciente y similares. En el caso del polinucleótido antisentido para el gen CD81 es aconsejable que la dosis sea normalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 mg, preferentemente de aproximadamente 0,001 a 10 mg para un paciente adulto, y la administración se realiza una vez durante varios días o varios meses.

25 En el caso del vector de retrovirus que contiene el polinucleótido antisentido, la dosis puede seleccionarse del intervalo de aproximadamente 1×10^3 ufp a 1×10^{15} ufp por kilogramo de peso del paciente al día en términos de una potencia de retrovirus. En el caso de la célula que tiene el polinucleótido antisentido introducido en ella es aconsejable realizar la administración a una dosis de 1×10^4 células/cuerpo a 1×10^{15} células/cuerpo.

30 Además, en este documento se desvela (i) un ARN bicatenario que contiene una parte de un ARN que codifica la proteína descrita en este documento y un ARN complementario al mismo, (ii) un agente que contiene el ARN bicatenario, (iii) una ribozima que contiene una parte de un ARN que codifica la proteína descrita en este documento, (iv) un agente que contiene la ribozima y (v) un vector de expresión que contiene un gen (ADN) que codifica la ribozima. Similarmente al polinucleótido antisentido, un ARN bicatenario, una ribozima y similares pueden perjudicar un ARN transcrito a partir del ADN de la invención o inhibir su función. El ARN bicatenario, la ribozima y similares que pueden inhibir la función de CD81 o el ADN que codifica el mismo pueden usarse como agente para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con el estilo de vida, especialmente diabetes.

El ARN bicatenario puede producirse diseñándose basándose en la secuencia del polinucleótido desvelado en este documento según un procedimiento conocido (por ejemplo, Nature, vol. 411, pág. 494, 2001). La ribozima puede producirse diseñándose basándose en la secuencia del polinucleótido desvelada en este documento según un procedimiento conocido (por ejemplo, TRENDS in Molecular Medicine, vol. 7, pág. 221, 2001). Por ejemplo, puede producirse reemplazando una parte de una secuencia de una ribozima conocida con una parte del ARN que codifica la proteína desvelada en este documento. La parte del ARN que codifica la proteína incluye una secuencia próxima a una secuencia consenso NUX (en la que N representa todas las bases y X representa bases distintas de G) que puede escindirse con una ribozima conocida, y similares. Si el ARN bicatenario o la ribozima se usa como agente de prevención o de tratamiento, puede formularse y administrarse del mismo modo que el polinucleótido antisentido. El vector de expresión en (v) se usa del mismo modo que en una terapia génica conocida y que en el agente de prevención o de tratamiento anterior.

(3) Marcador de enfermedad de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) y su aplicación

(3-1) Polinucleótido

El gen CD81 desvelado en este documento es un gen conocido que también se llama un gen TAPA-1. Por ejemplo, como gen CD81 humano se conoce un polinucleótido descrito en SEC ID N° 1 (n° de acceso de GenBank NM_004356) y un procedimiento para obtener el mismo también se conoce como se describe en Prasad SS y col., Brain Res., 639, 73-84, 1994.

Empezando con el hallazgo de que la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en las células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para EII, como se ha establecido anteriormente, se ha encontrado en el presente documento que la presencia o la ausencia de la afectación de EII o el grado de su afectación puede detectarse específicamente detectando la presencia o la ausencia de la expresión de este gen o el grado de la expresión y el diagnóstico de las enfermedades puede llevarse a cabo exactamente.

Por tanto, el polinucleótido es útil como una herramienta (marcador de enfermedad) por la que puede diagnosticarse tanto si el sujeto está afectado como si no por las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) o el grado de su afectación detectando la presencia o la ausencia de la expresión del gen en el sujeto o su grado.

El polinucleótido también es útil como herramienta de cribado (marcador de enfermedad) para detectar el cambio en la expresión del gen CD81 en el cribado de la sustancia candidata útil para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) como se describe en (1-1) antes.

El marcador de enfermedad desvelado en este documento se caracteriza por comprender un polinucleótido que tiene al menos 15 bases continuas y/o un polinucleótido complementario al mismo en la secuencia de bases del gen CD81.

Específicamente, el marcador de enfermedad desvelado en este documento puede incluir uno que comprenda un polinucleótido que tiene al menos 15 bases continuas y/o un polinucleótido complementario al mismo en la secuencia de bases del gen CD81 descrita en SEC ID N° 1.

El polinucleótido complementario (cadena complementaria, cadena opuesta) significa aquí un polinucleótido que tiene una relación de bases complementaria con la secuencia de longitud completa del polinucleótido que comprende la secuencia de bases del gen CD81 o la secuencia parcial que tiene una longitud de al menos 15 bases continuas en la secuencia de bases (aquí también se denomina en lo sucesivo "una cadena más" por comodidad) basándose en la relación del par de bases de A:T y G:C. Sin embargo, esta cadena complementaria puede no ser sólo una que tenga una secuencia completamente complementaria a la secuencia de bases de la cadena más deseada, sino también una que tenga una relación complementaria tal que pueda hibridarse con la cadena más deseada bajo condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas puede determinarse aquí basándose en una temperatura de fusión (T_m) de un ácido nucleico al que está unido un complejo o una sonda como se describe en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, vol. 152, Academic Press, San Diego CA). Por ejemplo, como condiciones de lavado después de la hibridación pueden mencionarse condiciones de "1 x SSC, SDS al 0,1%, 37°C". Es aconsejable que la cadena complementaria mantenga el estado hibridado con la cadena más deseada aún cuando se lave bajo tales condiciones. Condiciones más rigurosas pueden implicar lavar en las condiciones de aproximadamente "0,5 x SSC, SDS al 0,1%, 42°C" y condiciones adicionalmente rigurosas puede implicar lavar en condiciones de aproximadamente "0,1 x SSC, SDS al 0,1%, 65°C", aunque no está limitada a la misma. Ejemplos específicos de la cadena complementaria pueden incluir una cadena que comprende una secuencia de bases que tiene una relación completamente complementaria con la secuencia de bases de la cadena más deseada y una cadena que comprende una secuencia de bases homóloga a la cadena más al menos el 90%, preferentemente el 95%.

El polinucleótido en el lado de la cadena más puede incluir aquí no sólo una cadena que tiene la secuencia de bases del gen CD81 o su secuencia parcial, sino también una cadena que comprende una secuencia de bases que tiene

una relación complementaria con la secuencia de bases de la cadena complementaria.

El polinucleótido de la cadena más y el polinucleótido de la cadena complementaria (cadena opuesta) pueden usarse como marcador de enfermedad en forma de una cadena monocatenaria o una cadena bicatenaria, respectivamente.

El marcador de enfermedad desvelado en este documento de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) puede comprender específicamente un polinucleótido que comprende la secuencia de bases (secuencia de longitud completa) del gen CD81 o un polinucleótido que comprende su secuencia complementaria. Además, un polinucleótido que comprende la secuencia de longitud completa o la secuencia parcial de su secuencia complementaria también está disponible, siempre y cuando reconozca selectivamente (específicamente) el gen descrito en este documento o el polinucleótido derivado de este gen. En este caso, con respecto a la secuencia parcial, puede mencionarse el polinucleótido que tiene una longitud de al menos 15 bases continuas arbitrariamente seleccionadas de la secuencia de longitud completa o la secuencia de bases de su secuencia complementaria.

Aquí, "reconoce selectivamente (específicamente)" significa que el gen CD81 o el polinucleótido derivado del mismo puede detectarse específicamente en, por ejemplo, el procedimiento de transferencia Northern y que el gen CD81 o el polinucleótido derivado del mismo se forman específicamente en el procedimiento de RT-PCR. Sin embargo, no es crítico. Es aconsejable que un experto pueda juzgar el producto detectado o el producto resultante que va a derivarse de estos genes.

El marcador de enfermedad desvelado en este documento puede diseñarse usando, por ejemplo, el cebador 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) o el vector NTI (fabricado por Infomax) basándose en, por ejemplo, la secuencia de bases del gen CD81 indicada en SEC ID N° 1. Específicamente, como cebador o sonda puede usarse una secuencia candidata de un cebador o una sonda obtenida aplicando la secuencia de bases del gen CD81 a un software del cebador 3 o vector NTI o una secuencia que contiene al menos una parte de la secuencia.

Como marcador de enfermedad desvelado en este documento está disponible un marcador de enfermedad que tiene una longitud de al menos 15 bases continuas como se observa anteriormente. Específicamente, la longitud del mismo puede determinarse apropiadamente selectivamente dependiendo del uso del marcador.

(3-2) Polinucleótido como sonda o cebador

La detección (diagnóstico) de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) se realiza estimando la presencia o la ausencia de la expresión o el nivel de expresión (cantidad de expresión) del gen CD81 en una biopsia, especialmente un tejido del intestino grueso de un sujeto. En este caso, el marcador de enfermedad desvelado en este documento puede usarse como cebador para reconocer específicamente y amplificar un ARN formado por la expresión del gen anterior o un polinucleótido derivado del mismo o como sonda para detectar específicamente el ARN o el polinucleótido derivado del mismo.

Si el marcador de enfermedad desvelado en este documento se usa como cebador en la detección (diagnóstico de genes) de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), puede mencionarse un marcador de enfermedad que tiene una longitud de bases de normalmente 15 pb a 100 pb, preferentemente de 15 pb a 50 pb, más preferentemente de 15 pb a 35 pb. Si se usa como sonda de detección puede mencionarse un marcador de enfermedad que tiene una secuencia de bases de normalmente 15 pb a longitud completa, preferentemente de 15 pb a 1 kb, más preferentemente de 100 pb a 1 kb.

El marcador de enfermedad desvelado en este documento puede usarse como cebador o sonda en un modo usual en un procedimiento conocido para detectar específicamente un gen específico tal como un procedimiento de transferencia Northern, un procedimiento de RT-PCR o un procedimiento de hibridación *in situ*. La presencia o la ausencia de la expresión o el nivel de expresión del gen CD81 en las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) puede estimarse por este uso.

Como muestra que va a medirse puede usarse un ARN total que se prepara de una manera usual a partir de una parte de un tejido del intestino grueso de un sujeto muestreado por biopsia o similares o se recupera de un líquido de lavado intestinal o similares, o diversos polinucleótidos preparados basándose en el ARN según el tipo del procedimiento de detección usado.

El nivel de expresión génica del gen CD81 en la biopsia puede detectarse o determinarse usando un chip de ADN. En este caso, el marcador de enfermedad desvelado en este documento puede usarse como sonda del chip de ADN (por ejemplo, en el caso de Gene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, E de Affymetrix, se usa como sonda de polinucleótidos que tiene una longitud de 25 pb). Este chip de ADN se hibrida con el ADN o ARN de marcado preparados basándose en el ARN muestreado de la biopsia, y un complejo de la sonda (marcador de enfermedad de la invención) y el ADN o ARN de marcado formado por la hibridación se detecta usando la marca del ADN o ARN de marcado como índice, por lo que puede estimarse la presencia o la ausencia o el nivel de expresión (cantidad de

expresión) de la expresión del gen descrito en este documento en la biopsia.

Es aconsejable que el chip de ADN contenga uno o más marcadores de enfermedad desvelados en este documento que puedan unirse al gen CD81. El uso del chip de ADN que contiene múltiples marcadores de enfermedad hace que sea posible estimar la presencia o la ausencia de la expresión o el nivel de expresión de múltiples genes al mismo tiempo en una biopsia.

El marcador de enfermedad desvelado en este documento es útil para el diagnóstico y la detección de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) (diagnóstico de la presencia o la ausencia de afectación y un grado de afectación). Específicamente, el diagnóstico de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) usando el marcador de enfermedad puede realizarse juzgando una diferencia en el nivel de expresión génica del gen CD81 en la biopsia de un sujeto y la biopsia de una persona normal. En este caso, la diferencia en el nivel de expresión génica incluye no sólo una diferencia de si la expresión está presente o no, sino también un caso en el que, aún cuando la expresión se observe en tanto la biopsia del sujeto como la biopsia de la persona normal, una diferencia en la cantidad de expresión entre ellos sea de dos veces o más, preferentemente tres veces o más.

Específicamente, como la expresión del gen CD81 aumenta significativamente en las células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII), el gen se expresa en la biopsia del sujeto. Si la cantidad de expresión es al menos dos veces, preferentemente al menos tres veces la cantidad de expresión de la biopsia de la persona normal, se supone que el sujeto está afectado por la enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

(3-3) Anticuerpo

En este documento se desvela un anticuerpo que puede reconocer específicamente un producto de expresión (proteína) del gen CD81 (que también se denomina en lo sucesivo "CD81" en la memoria descriptiva) como marcador de enfermedad de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

Como anticuerpo puede mencionarse un anticuerpo que puede reconocer específicamente una proteína de CD81 que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID Nº 2. Los anticuerpos descritos en (2-1) antes también están disponibles.

A partir del hallazgo de que la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en las células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para EII, como se ha establecido antes, se encontró que la presencia o la ausencia de la afectación de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) o el grado de su afectación puede detectarse específicamente detectando la presencia o la ausencia del producto de expresión de este gen o el grado de su expresión y el diagnóstico de las enfermedades puede llevarse a cabo exactamente.

Por tanto, el anticuerpo es útil como una herramienta (marcador de enfermedad) por la que puede diagnosticarse tanto si el sujeto está afectado como si no por las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) o el grado de la enfermedad detectando la presencia o la ausencia de la expresión de la proteína en el sujeto o su grado.

El anticuerpo también es útil como herramienta de cribado (marcador de enfermedad) para detectar el cambio en la expresión de CD81 en el cribado de la sustancia candidata útil para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) como se describen en (1-2) antes.

CD81 humano también es una proteína conocida, y un procedimiento para obtener la misma es conocido como se describe en un documento (BRENDAN J. CLASSON y col., J Exp Med, 169, 1497-1502, 1989).

La forma del anticuerpo que va a usarse según la invención no está particularmente limitada y puede ser un anticuerpo policlonal en el que CD81 es un inmunógeno o su anticuerpo monoclonal. Además, un anticuerpo que tiene una afinidad de antígeno por un polipéptido que comprende normalmente al menos 8 aminoácidos continuos, preferentemente al menos 15 aminoácidos continuos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos de la proteína descrita en este documento también se incluye en el anticuerpo que va a usarse en este documento.

Los procedimientos para producir estos anticuerpos ya son muy conocidos, y el anticuerpo desvelado en este documento también puede producirse por estos procedimientos comunes [Current Protocol in Molecular Biology, capítulo 11.12 – 11.13 (2000)]. Específicamente, si el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, es posible que animales no humanos tales como conejos se inmunicen con CD81 expresado en *E. coli* o similares y se purifiquen por un procedimiento común o con un oligopéptido que tiene una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína descrita en este documento y se formen por un procedimiento común, por lo que el anticuerpo se obtiene a partir del suero de los animales inmunizados por un procedimiento común. Mientras tanto, en el caso del anticuerpo monoclonal, es posible que animales no humanos tales como ratones se inmunicen con CD81 expresado en *E. coli* o similares y se purifiquen por un procedimiento común o con un oligopéptido que tiene una parte de una secuencia

de aminoácidos de la proteína y las células del bazo y las células de mieloma resultantes estén fusionadas, por lo que el anticuerpo se obtiene a partir de las células de hibridoma resultantes (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel y col. (1987) Publish. John Wiley and Sons, Sección 11.4-11.11).

5 CD81 que se usa como inmunógeno en la producción del anticuerpo es una proteína conocida. Como se describe en (1-3) antes, por ejemplo, puede obtenerse mediante procedimientos, concretamente clonación de ADN, construcción de cada plásmido, transfección en un huésped, incubación de un transformante y recuperación de una proteína de un cultivo basándose en la información de secuencias (SEC ID N°: 1) proporcionada en este documento. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo según un procedimiento conocido para un experto, un procedimiento descrito en documentos [Molecular Cloning, T. Maniatis y col., CSH Laboratory (1983), ADN Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)] y similares.

15 El péptido parcial de CD81 también puede producirse por un procedimiento de síntesis química general (síntesis de péptidos) según una información de una secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) proporcionada en este documento.

20 El CD81 desvelado en este documento incluye no sólo una proteína asociada a cada secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID N°: 2, sino también su homólogo. El homólogo puede incluir una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID N°: 2 en la que uno o más aminoácidos están deletados, sustituidos o añadidos y que tiene una actividad inmunológicamente igual a la de la proteína original antes de la modificación.

25 La proteína que tiene aquí la misma actividad inmunológica puede incluir una proteína que induce una reacción inmunitaria específica en animales apropiados o células de los mismos y que pueden unirse específicamente a un anticuerpo anti-CD81.

30 El número de mutaciones o el sitio de mutación de los aminoácidos en la proteína no están particularmente limitados mientras se mantenga la actividad inmunológica de la misma. El índice de determinar cómo y en qué número tienen que estar sustituidos, insertados o deletados los residuos de aminoácidos sin perder la actividad inmunológica puede ser encontrado por un experto usando un conocido programa informático, por ejemplo, el software DNA Star. Por ejemplo, el número de mutaciones está normalmente dentro del 10% de todos los aminoácidos, preferentemente dentro del 5% de todos los aminoácidos, más preferentemente dentro del 1% de todos los aminoácidos. Los aminoácidos que van a estar sustituidos no están particularmente limitados, mientras que la proteína obtenida después de la sustitución mantenga una actividad inmunológica igual a la de CD81. En vista de la retención estructural de la proteína se prefieren aminoácidos similares a los aminoácidos antes de la sustitución en propiedades tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y propiedad anfipática de residuos. Por ejemplo, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe y Trp son aminoácidos clasificados en aminoácidos no polares; Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn y Gln son aminoácidos clasificados en aminoácidos sin carga; Asp y Glu son aminoácidos clasificados en aminoácidos ácidos; y Lys, Arg y His son aminoácidos clasificados en aminoácidos básicos. Por consiguiente, los aminoácidos que pertenecen al mismo grupo pueden seleccionarse apropiadamente usando estos como índice.

45 El anticuerpo que va a usarse según la invención puede prepararse usando un oligopéptido que tiene una parte de la secuencia de aminoácidos de CD81. No se requiere que un oligo(poli)péptido usado para la producción de este anticuerpo tenga una bioactividad funcional. Sin embargo, es aconsejable que el péptido tenga una inmunogenicidad igual a la de CD81. Puede mencionarse un oligo(poli)péptido que tiene esta inmunogenicidad y que comprende al menos 8 aminoácidos continuos, preferentemente al menos 15 aminoácidos continuos, más preferentemente al menos 20 aminoácidos continuos en la secuencia de aminoácidos de CD81.

50 La producción del anticuerpo contra el oligo(poli)péptido puede realizarse aumentando una reacción inmunológica con diversos adyuvantes según los huéspedes. Ejemplos de tales adyuvantes, aunque no están limitados, incluyen adyuvante de Freund, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioli plurónico, polianión, péptidos, emulsiones de aceite, tensioactivos tales como hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol, y adyuvantes humanos tales como BCG (Bacille billie de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Como el anticuerpo que va a usarse según la invención tiene una propiedad de unirse específicamente a CD81, la proteína expresada en un tejido de un sujeto puede detectarse específicamente usando este anticuerpo. Es decir, el anticuerpo es útil como sonda para detectar la presencia o la ausencia de la expresión de proteína de CD81 en un tejido de un sujeto.

60 Específicamente, CD81 puede detectarse por un procedimiento de detección conocido tal como un procedimiento de transferencia Western o ELISA con el anticuerpo desvelado en este documento empleado como sonda en un modo común usando un extracto de tejido o proteína preparado por un procedimiento común a partir de una parte de un tejido del intestino grueso de un sujeto que se recoge por biopsia o similares o se recupera de un líquido de lavado intestinal o similares.

65 En el diagnóstico de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) es aconsejable juzgar una diferencia en la cantidad entre CD81 en la biopsia del sujeto y la proteína en la biopsia normal. En este caso, la diferencia en la

cantidad de proteína incluye la presencia/ausencia de la proteína o la diferencia en la cantidad de proteína a la que la cantidad de proteína es diferente al menos dos veces, preferentemente al menos tres veces. Específicamente, como la expresión del gen CD81 aumenta en las células inductoras de EII en comparación con las células no inductoras de EII, CD81 está presente en la biopsia del sujeto, y si se juzga que la cantidad de expresión es al menos dos veces, preferentemente al menos tres veces la cantidad de expresión en la biopsia normal, se insinúa la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

(4) Procedimiento de detección (procedimiento de diagnóstico) de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII)

En este documento se desvela un procedimiento de detección (procedimiento de diagnóstico) de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) usando el marcador de enfermedad anterior.

Específicamente, el procedimiento de detección desvelado en este documento (procedimiento de diagnóstico) comprende recoger una parte de un tejido del intestino grueso de un sujeto por biopsia o similares o recuperarlo de un líquido de lavado intestinal o similares, detectar un nivel de expresión génica de un gen CD81 asociado a enfermedad inflamatoria del intestino contenido en él y una proteína (CD81) derivada de este gen y medir la cantidad de expresión o la cantidad de proteína para detectar (diagnosticar) la presencia o la ausencia de la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) o su grado. El procedimiento de detección (diagnóstico) desvelado en este documento también puede detectar (diagnosticar) la presencia o la ausencia de la mejora de la enfermedad o su grado en el caso de administrar un agente terapéutico para mejorar la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) a un paciente de esta enfermedad.

El procedimiento de detección desvelado en este documento es un procedimiento que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) una etapa de poner en contacto una biopsia de un sujeto con el marcador de enfermedad descrito en este documento,
- (b) una etapa de medir un nivel de expresión génica de un gen CD81 en la biopsia o una cantidad de proteína CD81 usando el marcador de enfermedad como índice, y
- (c) una etapa de juzgar la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) basándose en los resultados en (b).

Como biopsia usada aquí puede mencionarse una muestra preparada a partir de una biopsia (un tejido del intestino grueso, su tejido de alrededor o similares) del sujeto. Ejemplos específicos de la misma puede incluir una muestra que contiene ARN preparada a partir del tejido, una muestra que contiene un polinucleótido formado adicionalmente a partir del mismo y una muestra que contiene la proteína preparada a partir del tejido. La muestra que contiene un ARN, polinucleótido o proteína tal puede prepararse por un procedimiento común a partir de una parte del tejido del intestino grueso del sujeto recogido por biopsia o similares o recuperado de un líquido de lavado intestinal o similares.

El procedimiento de diagnóstico desvelado en este documento puede realizarse específicamente del siguiente modo según el tipo de la biopsia que va a medirse.

(4-1) En el caso de usar un ARN como biopsia que va a medirse

Si un ARN se usa como muestra que va a medirse, la detección de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) puede realizarse específicamente mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) una etapa de unir un ARN preparado a partir de una biopsia de un sujeto o un polinucleótido complementario transcrito a partir del mismo al marcador de enfermedad descrito en este documento (un polinucleótido que tiene al menos 15 bases continuas en la secuencia de bases del gen CD81 y/o un polinucleótido complementario al polinucleótido),
- (b) una etapa de medir el ARN derivado de la biopsia o el polinucleótido complementario transcrito a partir del ARN en la que el ARN o el polinucleótido está unido al marcador de enfermedad usando el marcador de enfermedad como índice, y
- (c) una etapa de juzgar la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) basándose en los resultados de medición en (b).

Si se usa un ARN como sustancia que va a medirse, el procedimiento de detección desvelado en este documento (procedimiento de diagnóstico) se realiza detectando y midiendo el nivel de expresión del gen CD81 en el ARN. Específicamente puede realizarse realizando un procedimiento conocido tal como un procedimiento de transferencia Northern, un procedimiento de RT-PCR, un procedimiento de análisis de chip de ADN o un procedimiento de análisis de hibridación *in situ* usando el marcador de enfermedad desvelado en este documento que comprende el polinucleótido (un polinucleótido que tiene al menos 15 bases continuas en la secuencia de bases del gen CD81 y/o su polinucleótido complementario) como cebador o una sonda.

En el caso de usar el procedimiento de transferencia Northern, la presencia o la ausencia de la expresión del gen CD81 en el ARN o su nivel de expresión puede detectarse y medirse usando el marcador de enfermedad desvelado en este documento como sonda. Específicamente puede mencionarse un procedimiento que comprende marcar el marcador de enfermedad desvelado en este documento (cadena complementaria) con un radioisótopo (^{32}P , ^{33}P o similares: RI), una sustancia fluorescente o similares, hibridar el marcador marcado con un ARN derivado de una biopsia de un sujeto transferido sobre una membrana de nailon o similares de una manera usual y luego detectar y medir una señal derivada de la sustancia o la ausencia de la sustancia fluorescente) del marcador de enfermedad en la doble cadena resultante del marcador de enfermedad (ADN) y el ARN con un detector de radiación (BAS-1800II, fabricado por Fuji Photofilm Co., Ltd.) o un detector de fluorescencia. También es posible usar un procedimiento que comprende marcar un marcador de enfermedad (ADN de sonda) con el sistema AlkPhos Direct Labelling and Detection (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según su protocolo, hibridar el marcador marcado con un ARN derivado de una biopsia de un sujeto y luego detectar y medir una señal derivada del marcador marcado de enfermedad con un Multi Bio Imager STORM860 (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech). En el caso de usar el procedimiento de RT-PCR, la presencia o la ausencia de la expresión del gen CD81 en el ARN o su nivel de expresión puede detectarse y medirse usando el marcador de enfermedad desvelado en este documento como cebador. Específicamente puede mencionarse un procedimiento que comprende preparar un ADNc a partir de un ARN derivado de una biopsia de un sujeto de una manera usual, hibridar el ADNc con un par de cebadores [una cadena más unida al ADNc (cadena -) y una cadena opuesta unida a la cadena +] preparados a partir del marcador de enfermedad desvelado en este documento de manera que pueda amplificarse la región del gen CD81 diana con el ADNc como molde, realizar la PCR de una manera usual y detectar el ADN bicatenario amplificado resultante. En la detección del ADN bicatenario amplificado es posible usar un procedimiento en el que se detecta un ADN bicatenario marcado producido realizando la PCR usando un cebador previamente marcado con RI o una sustancia fluorescente, un procedimiento en que el ADN bicatenario resultante se transfiera sobre una membrana de nailon o similar de una manera usual y se hibride con un marcador de enfermedad marcado como sonda para realizar la detección o similares. El producto de ADN bicatenario marcado así producido puede medirse con Agilent 2100 Bioanalyzer (fabricado por Yokokawa Analytical Systems). Además, también es posible que se prepare una disolución de RT-PCR con reactivos de RT-PCR SYBR Green (fabricados por Applied Biosystems) según su protocolo y la reacción se realice con el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (fabricado por Applied Biosystems) para detectar el producto de reacción.

En el caso de usar el análisis de chip de ADN puede mencionarse un procedimiento que comprende preparar un chip de ADN al que está unido el marcador de enfermedad desvelado en este documento como sonda de ADN (monocatenario o bicatenario), hibridarlo con un ARNc preparado a partir de un ARN derivado de una biopsia de un sujeto de una manera usual y unir la doble cadena resultante del ADN y el ARNc a la sonda de marcado preparada a partir del marcador de enfermedad desvelado en este documento para realizar la detección. Como chip de ADN también está disponible un chip de ADN que puede detectar y medir el nivel de expresión génica del gen CD81. Como chip de ADN que puede detectar y medir el nivel de expresión del gen puede mencionarse Gene Chip Human Genome U95 A, B, C, D, E de Affymetrix. La detección y la medición del nivel de expresión génica del gen CD81 en el ARN del sujeto se describirá en detalle en los ejemplos.

(4-2) Uso de una proteína como biopsia que va a medirse

Si se usa una proteína como sustancia que va a medirse, el procedimiento para detectar (diagnosticar) las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) se realiza detectando CD81 en una biopsia y midiendo su cantidad. Específicamente puede realizarse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) una etapa de unir una proteína preparada a partir de una biopsia de un sujeto al marcador de enfermedad desvelado en este documento sobre un anticuerpo (un anticuerpo que reconoce CD81),
- (b) una etapa de medir la proteína derivada de la biopsia unida al marcador de enfermedad usando el marcador de enfermedad como índice, y
- (c) una etapa de juzgar la afectación de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) basándose en los resultados de medición en (b).

Más específicamente puede mencionarse un procedimiento para detectar y determinar cuantitativamente CD81 mediante un procedimiento conocido tal como un procedimiento de transferencia Western usando un anticuerpo (un anticuerpo que reconoce CD81) como marcador de enfermedad desvelado en este documento sobre un anticuerpo.

El procedimiento de transferencia Western puede realizarse realizando el marcado con el marcador de enfermedad desvelado en este documento como anticuerpo primario y luego con un anticuerpo (unido al anticuerpo primario) marcado con un radioisótopo tal como ^{125}I , una sustancia fluorescente o una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) y midiendo señales derivadas del radioisótopo, la sustancia fluorescente o similares del compuesto marcado resultante con un medidor de radiación (BAS-1800II: fabricado por Fuji Photofilm), un detector de fluorescencia o similares. Además, también es posible que después de usar el marcador de enfermedad desvelado en este documento como anticuerpo primario la detección se realice con el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) según su protocolo y la medición se lleve a cabo con un Multi Bio Imager STORM860 (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech.)

La función (actividad) de CD81 que va a medirse en el anterior procedimiento ya se conoce y tiene una dependencia recíproca recomendada con la cantidad y la función o actividad de la proteína. Por consiguiente, la detección (diagnóstico) desvelada en este documento de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) también puede realizarse midiendo la función (actividad) de la proteína en lugar de medir la cantidad de proteína. Es decir, en este documento también se desvela un procedimiento para detectar (diagnosticar) las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) en el que la función conocida (actividad) de CD81 se mide como índice y se estima según el procedimiento conocido [específicamente se refiere a (1-3) antes].

(4-3) Diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino (EII)

El diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino (EII) puede realizarse comparando el nivel de expresión génica del gen CD81 en una biopsia (un tejido del intestino grueso o similares) de un sujeto o una cantidad, una función o una actividad (esto se denominado algunas veces en lo sucesivo un "nivel de proteína" en combinación) de la proteína (CD81) que es el producto de expresión del gen con el nivel de expresión génica o el nivel de proteína en una biopsia normal (un tejido del intestino grueso o similares) y juzgar la diferencia entre ellos.

En este caso se requieren biopsias (muestras que contienen un ARN o una proteína) recogidas y preparadas a partir de una biopsia normal. Éstas pueden obtenerse recogiendo biopsias (tejidos del intestino grueso o similares) de una persona sin afectar por la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) con una biopsia y similares o recuperando la misma de un líquido de lavado intestinal o similares. Casualmente, "una persona sin afectar por enfermedad inflamatoria del intestino (EII)" aquí referida significa una persona que está al menos libre de un síntoma subjetivo de la enfermedad inflamatoria del intestino y se diagnostica preferentemente que no está afectada por la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) como resultado de un procedimiento de detección tal como endoscopia, enema de bario o biopsia de órgano digestivo. En la memoria descriptiva, "una persona sin afectar por enfermedad inflamatoria del intestino (EII)" se denomina en lo sucesivo algunas veces simplemente una persona normal.

La comparación en el nivel de expresión génica o la cantidad (nivel) de la proteína entre la biopsia del sujeto y la biopsia normal (biopsia de persona sin afectar por la enfermedad inflamatoria del intestino (EII)) puede realizarse realizando la medición de la biopsia del sujeto y la biopsia de la persona normal simultáneamente. Si la medición no se realiza simultáneamente, un valor promedio o un valor medio estadístico de los niveles de expresión génica de genes CD81 obtenidos midiendo múltiples (al menos 2, preferentemente al menos 3, más preferentemente al menos 5) biopsias normales bajo condiciones de medición uniformes o de cantidades (niveles) de proteínas (CD81) como productos de expresión de estos genes puede usarse en la comparación con el nivel de expresión génica o la cantidad de proteína de la persona normal.

El juicio de si un sujeto tiene o no la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) también puede realizarse usando como índice el hecho de que el nivel de expresión génica del gen CD81 o el nivel de proteína de su producto de expresión en la biopsia del sujeto sea al menos dos veces, preferentemente al menos tres veces hasta el de en la biopsia de la persona normal.

Si el nivel de expresión génica del gen CD81 o el nivel de proteína del sujeto es superior al de la persona normal, el sujeto se juzga que está afectado por la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) o se supone que está afectado por esta enfermedad.

La invención se ilustra más específicamente más adelante con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada en absoluto por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII)

Modelos animales de EII inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) pueden inducirse según un procedimiento descrito en Gastroenterology, vol. 96, pág. 795-803 (1989) o similares.

(1) Formación de una disolución de sensibilización

Se disolvieron 0,5 g de albúmina de huevo (fabricada por Sigma) y 0,5 g de K_2CO_3 (fabricado por Nacalai Tesque) en 25 ml de agua destilada para inyección (disolución de albúmina de huevo). Se disolvieron 0,5 g de TNBS (fabricado por Nacalai Tesque) en 25 ml de K_2CO_3 0,1 M (disolución de TNBS). La disolución de albúmina de huevo y la disolución de TNBS se mezclaron y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La disolución con agitación se dializó contra $NaHCO_3$ 0,01 M (fabricado por Nacalai Tesque) a través de un dializador (membrana Spectra/Por de MWCO: 10.000 fabricada por Spectrum Medical Industries Inc.). El dializado se sometió a determinación cuantitativa de proteína con reactivo de ensayo de proteínas BCA (fabricado por Pierce). Se refrigeraron 2 mg/ml del dializado como disolución de sensibilización, y se usó disolviéndose cuando se usó.

(2) Modelos de enfermedad inflamatoria del intestino inducida por TNBS

Se inyectaron (sensibilizaron) subcutáneamente adyuvante completo de Freund (CFA: fabricado por Difco) y 2 mg/ml de la disolución de sensibilización en el lomo de un ratón SJL/J de 4 a 6 semanas de edad (comprado de Nippon Charles River) como una emulsión a una tasa de 0,1 ml/cabeza. En el día 7 después de la sensibilización se administraron intrarrectalmente 10 mg/ml de una disolución de etanol al 50% en TNBS (fabricada por Nacalai Tesque) [se inyectaron (expusieron) 0,2 ml/cabeza insertando una sonda en una parte de hasta 3 cm del ano] bajo anestesia con éter. El síntoma de colitis se puntuó según las condiciones de las heces [heces normales (puntuación: 0), heces sueltas (puntuación: 1) y diarrea (puntuación: 2)]. El ratón afectado por colitis se sometió a eutanasia en el día 6 después de la exposición y se extrajeron el bazo y el ganglio linfático mesentérico.

(3) Incubación de células

Las células del ganglio linfático mesentérico y las células del bazo tratadas con un agente hemolítico se inocularon en un matraz de cultivo (matraz 75T; fabricado por Iwaki Glass) en D-MEM (fabricado por Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 10% (fabricado por BIOWHITTAKER) y antibiótico al 1%-antimicótico con el número de células 10^6 . Las células se incubaron durante 48 horas bajo las tres siguientes condiciones. Las células se incubaron en una estufa de incubación de CO₂ bajo 5% de CO₂ a 37°C. Después de la incubación, las células se recuperaron, se disolvieron con TRIZOL (fabricado por LIFE TECHNOLOGIE) y se guardaron a -80°C. El compuesto A es un compuesto que tiene una actividad de curación de colitis administrándolo a modelos animales de EII y una actividad para inhibir la inducción de EII. Es un compuesto descrito en el documento JP-A-2002-161084, concretamente 3-cloro-2-[1-(4-morfolin-4-ilfenil)ciclobutil]-4,5,6,7-tetrahidropirazol[1,5-a]pirimidina.

A: sin aditivo

B: adición de 0,2 µg/ml de la enterotoxina B estafilocócica (fabricada por Sigma)

C: adición de 0,2 µg/ml de la enterotoxina B estafilocócica (fabricada por Sigma) y 10 µM del compuesto A

Las células de las condiciones A y C son células no inductoras de EII que no inducen el síntoma de colitis en ratones normales incluso mediante transferencia a los ratones normales, mientras que las células de la condición B son células inductoras de EII que inducen el síntoma de colitis por ser transferidas a ratones normales. Es decir, el factor causal de inducir el estado patógeno de colitis puede encontrarse detectando el cambio de genes de linfocitos B con respecto a células A y C.

Ejemplo 2

Análisis de la expresión génica de células patógenas para EII y células no patógenas para EII con un chip de ADN

(1) Preparación de un ADNc a partir de un ARN total

Se preparó un ARN total a partir del extracto de TRIZOL obtenido en el Ejemplo 1 según el protocolo adjunto. Este ARN total se purificó con el kit RNeasy Mini (fabricado por Qiagen), y luego se realizó la posterior síntesis de ADNc. El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng del ARN total usando el sistema de elección SuperScript (fabricado por Invitrogen), siempre y cuando se usaran 100 pmol del cebador T7-(24)dT (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech) como cebador. El ADNc sintetizado se purificó con una columna de purificación de ADN (fabricada por Qiagen) y se concentró por precipitación en etanol. Entonces se sintetizó un ARNc mediante transcripción *in vitro* (kit MEGAScript T7: fabricado por Ambion) usando el ADNc como molde. El ARNc se purificó con el kit RNeasy Mini (fabricado por Qiagen), y se sintetizó un ADNc usando de nuevo el sistema de elección SuperScript (fabricado por Invitrogen) basándose en este ARNc. En la segunda síntesis de ADNc se usó un hexámero al azar como cebador en la síntesis de la primera cadena (codificante), y el cebador T7-(24)dT como cebador en la síntesis de la segunda cadena (no codificante) (nota: ARNc=antisentido). El ADNc sintetizado se purificó por una columna de purificación de ADN, seguido de medición de la concentración. Por los procedimientos anteriores, cada ADNc se obtuvo a partir de cada ARN total preparado en el Ejemplo 1.

(2) Preparación de un ARNc marcado a partir de un ADNc

Se añadió agua tratada con DEPC a cada ADNc en una cantidad correspondiente a 200 ng para ajustar el volumen a 22 µl, y se mezcló con 4 µl de 10 x tampón de reacción HY contenido en el kit de marcado de transcritos de ARN de alto rendimiento BioArray (fabricado por ENZO), 4 µl de 10 x ribonucleótidos marcados con biotina contenidos en este kit, 4 µl de 10 x DTT contenido en este kit, 4 µl de 10 x mezcla inhibidora de ARNasa contenida en este kit y 2 µl de 20 x ARN Polimerasa T7 contenida en este. Éstos se hicieron reaccionar a 37°C durante 5 horas para preparar un ARNc marcado. Después de la reacción se añadieron 60 µl de agua tratada con DEPC a la disolución de reacción, y entonces el ARNc marcado resultante se purificó con el kit RNeasy Mini (fabricado por Qiagen) según el protocolo adjunto.

(3) Fragmentación de un ARNc marcado

Se calentaron 40 µl de una disolución de reacción obtenida añadiendo 8 µl de 5 x tampón de fragmentación [Tris-acetato 200 mM, pH 8,1 (fabricado por Sigma), acetato de potasio 500 mM (fabricado por Sigma) y acetato de magnesio 150 mM (fabricado por Sigma)] a una disolución que contenía 20 µg de cada ARNc marcado a 94°C durante 35 minutos, y luego se pusieron en hielo. De este modo, el ARNc marcado se fragmentó.

(4) Hibridación de un ARNc fragmentado y una matriz de sondas

Se mezclaron 40 µl de cada ARNc fragmentado con 4 µl del oligonucleótido B de control 5 nM (fabricado por Amersham), 4 µl de 100 x mezcla de ARNc de control, 40 µg de ADN de esperma de arenque (fabricado por Promega), 200 µg de BSA acetilado (fabricado por Gibco-BRL), 200 µl de 2 x tampón de hibridación MES [MES 200 mM, 2 M [Na⁺], EDTA 40 mM y Tween 20 al 0,02% (fabricado por Pierce), pH 6,5 a 6,7] y 144 µl de agua tratada con DEPC para obtener 400 µl de una mezcla híbrida. Cada una de las mezclas híbridas resultantes se calentó a 99°C durante 5 minutos y adicionalmente a 45°C durante 5 minutos. Después del calentamiento, la centrifugación se realizó a temperatura ambiente y 14.000 rpm durante 5 minutos para obtener un sobrenadante de mezcla híbrida.

Mientras tanto, una matriz de sondas Human Genome U95 (fabricada por Affymetrix) llena de 1 x tampón de hibridación MES se giró dentro de una estufa híbrida a 45°C y 60 rpm durante 10 minutos, y entonces se eliminó 1 x tampón de hibridación MES para preparar una matriz de sondas. Se añadieron 200 µl de cada sobrenadante de la mezcla híbrida resultante a la matriz de sondas y se giraron dentro de la estufa híbrida a 45°C y 60 rpm durante 16 horas para obtener una matriz de sondas hibridada con el ARNc fragmentado.

(5) Tinción de la matriz de sondas

Después de recuperarse la mezcla híbrida y sacarse de cada una de las matrices de sondas hibridadas resultantes, la matriz de sondas se cargó con tampón de lavado no riguroso [6 x SSPE (dilución de 20 x SSPE (fabricado por Nacalai Tesque), Tween 20 al 0,01% y antiespumante 0-30 al 0,005% (fabricado por Sigma)]. A continuación, la matriz de sondas hibridada con el ARNc fragmentado se fijó en una posición predeterminada de GeneChip Fluidics Station 400 (fabricada por Affymetrix) cargada con tampón de lavado no riguroso y tampón de lavado riguroso (MES 100 mM, NaCl 0,1 M y Tween 20 al 0,01%). Después, la matriz de sondas se teñó con una disolución de tinción primaria [10 µg/ml de estreptavidina-ficoeritina (SAPE) (fabricada por Molecular Probe), 2 mg/ml de BSA acetilado, MES 100 mM, NaCl 1 M (fabricado por Ambion), Tween 20 al 0,05% y antiespumante 0-30 al 0,005%] y una disolución de tinción secundaria [100 µg/ml de IgG de cabra (fabricada por Sigma), 3 µg/ml de anticuerpo anti-estreptavidina biotilado (fabricado por Vector Laboratories), 2 mg/ml de BSA acetilado, MES 100 mM, NaCl 1 M, Tween 20 al 0,05% y antiespumante 0-30 al 0,005%] según un protocolo de tinción EuKGE-WS2.

(6) Barrido de una matriz de sondas y (7) análisis de una cantidad de expresión génica

Las matrices de sondas teñidas se sometieron al escáner HP GeneArray (fabricado por Affymetrix) para leer los patrones de tinción.

Las expresiones de los genes sobre las matrices de sondas se analizaron con el sistema GeneChip Workstation (fabricado por Affymetrix) basándose en los patrones de tinción. Entonces, la normalización se realizó según el protocolo de análisis y se calculó la cantidad de expresión (diferencia promedio) de cada sonda (cada gen) en cada muestra. Con respecto a las mismas sondas se obtuvo un valor promedio de las cantidades de expresión génica para cada tipo de la muestra, y luego se obtuvo la tasa de cambio en la cantidad de expresión entre los tipos respectivos de las muestras.

Ejemplo 3

Análisis del cambio en expresión

A partir de los resultados analíticos de las expresiones génicas por los análisis del chip de ADN realizado en el Ejemplo 2, primero se seleccionó un conjunto de sondas en el que se aumentó o se disminuyó la expresión en células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que contenían enterotoxina B estafilocócica (denominada en lo sucesivo algunas veces abreviada "SEB") en comparación con células no patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) sin SEB.

Del conjunto de sondas se seleccionaron 486 sondas en las que la expresión disminuyó o aumentó en las células no patógenas para EII que contenían SEB y compuesto A en comparación con las células patógenas para EII estimuladas con SEB.

Posteriormente, de estas 486 sondas se seleccionaron 56 sondas que son un gen asociado a inflamación inmunológica, una molécula de la superficie celular y un gen del factor de crecimiento para seleccionar sondas que tienen una mayor relación con el estado patógeno. Además, de estas 56 sondas se seleccionaron genes que participan en el estado patógeno de EII y tienen una función como fármaco diana por limitación al cambio de una población de células contenida en las células analizadas.

Por consiguiente, se seleccionaron un total de diez genes, gen IL-17, gen IL-9, gen linfotóxina α , gen receptor β de IL-10, gen DAP12, gen TCR $V\gamma 4$, gen integrina $\beta 1$, gen CD81, gen CDw40 y gen receptor A1 similar a Ig emparejada (Tabla 1).

5 Las células no patógenas para EII incubadas sin estimulación aumentan la patogenicidad en estado patógeno por estimulación por SEB de manera que se convierten en células patógenas para EII. Si el compuesto A se añade a las células patógenas para EII, la patogenicidad en estado patógeno se inhibe, y las células se convierten en células no patógenas para EII. Por consiguiente, se ha considerado que el gen IL-17, el gen IL-9, el gen TCR $V\gamma 4$, el gen CD81 y el gen CDw40 en los que aumenta la cantidad de expresión génica por la estimulación por SEB y disminuye por la adición del compuesto A (Tabla 1) son genes que pueden aplicarse como marcador de enfermedad que refleja las enfermedades inflamatorias del intestino. Se ha considerado que la afectación de las enfermedades inflamatorias del intestino o la progresión del estado patógeno de las mismas puede inhibirse o mejorarse disminuyendo la expresión de estos genes o la expresión o la función (actividad) de las proteínas codificadas por estos genes. Se ha considerado adicionalmente que el gen linfotóxina α , el gen receptor β de IL-10, el gen DAP12, el gen integrina $\beta 1$ y el gen receptor A1 similar a Ig emparejada en los que la cantidad de expresión génica disminuye por estimulación por SEB y aumenta mediante la adición del compuesto A (Tabla 1) también pueden aplicarse como marcador de enfermedad que refleja las enfermedades inflamatorias del intestino, y que la afectación de las enfermedades inflamatorias del intestino o la progresión del estado patógeno de las mismas puede inhibirse o mejorarse aumentando la expresión de estos genes o la expresión o la función (actividad) de proteínas codificadas por estos genes. La tabla muestra los resultados de los análisis de chip de células sin aditivo indicadas por "Cont", células incubadas con SEB indicadas por "SEB" y células incubadas con SEB y compuesto A indicadas por "SEB+Compuesto".

Tabla 1

Nombre de la sonda	Nombre del gen	Señal de la expresión del chip de gen		
		Cont	SEB	SEB+Compuesto
99349_at	IL-17	17,4	246,9	172,4
96574_at	IL-9	50,1	111,8	96,4
102630_s_at	Linfotóxina α	282,7	168,9	220,6
99491_at	IL-10R β	1103,7	703,9	1000,9
100397_at	DAP12	1293,8	900,4	1144,2
102745_at	TCRV $\gamma 4$	24,5	35,9	33,1
100124_r_at	Integrina $\beta 1$	230,0	149,3	149,4
101495_at	CD81	179,8	210,4	195,1
92962_at	CDw40	38	72,8	63,9
100328_s_at	receptor A1 similar a Ig emparejada	917,7	705,7	791,2

25 Ejemplo 4

Función del compuesto A para IFN- γ intracelular

30 En el interferón gamma [IFN- γ : J. Exp. Med 182:1281-1290 (1995)] ya conocido como un factor patógeno de las enfermedades inflamatorias del intestino, además de los diez genes (gen IL-17, gen IL-9, gen linfotóxina α , gen receptor β de IL-10, gen DAP12, gen TCR $V\gamma 4$, gen integrina $\beta 1$, gen CD81, gen CDw40 y gen receptor A1 similar a Ig emparejada) seleccionados en el Ejemplo 3, la expresión aumentó en las células inductoras de EII que contenían SEB en comparación con las células no patógenas para EII sin SEB como resultado del análisis del chip de ADN de la expresión génica. Además, era un factor en el que la expresión disminuyó en las células no patógenas para EII estimuladas con SEB y compuesto A en comparación con las células patógenas para EII estimuladas con SEB.

40 En el supuesto de que una población de células sobre la que el compuesto A actúa sea la misma que una población de células que inhibe una patogenicidad de enfermedad inflamatoria del intestino (EII) por el compuesto A, las investigaciones se realizaron para encontrar una población de células patógenas para EII. Específicamente, como el IFN- γ intracelular es fácil de detectar, el compuesto A actúa en cada población de células que expresan cualquiera de los factores seleccionados en el Ejemplo 3, y se examinó que uno de los factores seleccionados en el Ejemplo 3 participaba en realidad profundamente en la patogenicidad de EII usando la cantidad de IFN- γ intracelular como índice.

45 La IL-9 intracelular y la linfotóxina α intracelular no pudieron detectarse a falta de un reactivo analítico o similares. Con respecto a IL-17 se informó de que un anticuerpo anti-IL-17 empeoraba el síntoma del modelo de colitis [Nihon

Shokaki Kanren Gakkai Shukan (DDW-Japan 2003), Shokaki Byo Poster 337, Shiga Medical Collage, Shokaki Naikaj y se sugirió que IL-17 era un factor de mejora de colitis. Por tanto, se encontró que IL-17 mostraba una función opuesta en la búsqueda de un factor inductor de colitis deseado. Por consiguiente, IL-17 se excluyó en el análisis. Además, en la integrina $\beta 1$ como molécula de la superficie celular hay diversas células de expresión, y se juzga que la identificación de una población de células sobre la que actúa el compuesto A es imposible a partir de los resultados analíticos. Por tanto, la integrina $\beta 1$ se excluyó del análisis. DAP 12 como molécula de la superficie celular no pudo examinarse a falta de un reactivo analítico o similares.

(1) Preparación e incubación de células

Células de ganglio linfático mesentérico y células del bazo tratadas con reactivo de hemólisis se prepararon mediante el procedimiento del Ejemplo 1 y se incubaron en un matraz de cultivo (matraz 25T; fabricado por Iwaki Glass) en D-MEM (fabricado por Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 10% (fabricado por BIOWHITTAKER) y antibiótico al 1%-antimicótico con el número de células $3,3 \times 10^7$. Las células se incubaron bajo las dos siguientes condiciones durante 48 horas. Se añadieron 4,5 ul de BD Golgistop (fabricado por BD Biosciences) al medio, y la incubación se realizó adicionalmente durante 12 horas. La incubación de células se realizó en una estufa de incubación de CO_2 bajo 5% de CO_2 a 37°C . Después de la incubación, las células se recuperaron y se midió IFN- γ en linfocitos T positivos para CD81.

A: adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina B estafilocócica (fabricada por Sigma)

B: adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de enterotoxina B estafilocócica (fabricada por Sigma) y 10 μM de un compuesto del documento JP-A-2002-161084

(2) Medición de IFN- γ intracelular

Las células se recuperaron y se suspendieron en un tampón de tinción (tampón fosfato que contiene azida de sodio al 0,09% y albúmina de suero bovino al 1%). El número de células viables se contó con azul de tripano y se pusieron 10^6 células/100 ul en un tubo de Eppendorf y se añadió 1 ul de un anticuerpo anti-CD16/CD32. La incubación se realizó a 4°C durante 15 minutos. Después de lavarse las células, a las células se añadió un anticuerpo marcado con FITC (fluoroisotiocianato) y un anticuerpo marcado con biotina en una cantidad de 1 $\mu\text{g}/10^6$ células (en 50 ul de un tampón de tinción), y la incubación se realizó a 4°C durante 15 minutos. Se usó un anticuerpo anti-TCRV $\gamma\delta$, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-TCRV $\beta 3$, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD40 o un anticuerpo anti-CD49d como anticuerpo marcado con FITC. Se usó un anticuerpo anti-CD40L, un anticuerpo anti-CD81 o un anticuerpo anti-IL-10R como anticuerpo marcado con biotina. Después de lavarse las células, a las células se añadió 1 ul de PerCP marcado con estreptavidina en una cantidad de 1 $\mu\text{g}/10^6$ células (en 50 ul de un tampón de tinción) y la incubación se realizó a 4°C durante 15 minutos. Después del lavado, las células se centrifugaron, y a las mismas se añadió 0,1 ml/tubo de BD Cytotfix/Cytoperm. La incubación se realizó a 4°C durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces con 1 ml/tubo de 1 x BD Perm/disolución de lavado y luego se centrifugaron. En 50 ul de 1 x BD Perm/disolución de lavado se añadió un anticuerpo anti-IFN- γ marcado con PE (ficoeritrina) a las células en una cantidad de 1 $\mu\text{g}/10^6$ células, y la incubación se realizó a 4°C durante 30 minutos. Las células resultantes se lavaron dos veces con 1 ml/tubo de 1 x BD Perm/disolución de lavado y luego se desechó el sobrenadante. Las células precipitadas por centrifugación se desprendieron, y después de sustituirse con un tampón de tinción el análisis se realizó con FACSCalibur (fabricado por BD Biosciences). La centrifugación se realizó a 4.000 rpm. y 4°C durante 3 minutos (separador centrifugo: TOMY MRX-152, rotor: TMA-6). Con respecto a la intensidad de fluorescencia, FITC se midió con FL1, PE con FL2 y PerCP con FL3, respectivamente. Como anticuerpo anti-IL-10R marcado con biotina se usó un anticuerpo fabricado por Biolegend, mientras que como todos los otros anticuerpos se usaron anticuerpos fabricados por BD Biosciences.

Los resultados se mostraron en la Tabla 2. Una tasa de presencia (%) de poblaciones de células que tienen diversos marcadores de la superficie celular, una tasa de células positivas para IFN- γ intracelular presente en cada población de células y reducidas por el compuesto A ("células reaccionadas con el compuesto" en la tabla) cuando una tasa de células positivas para IFN- γ intracelular reducidas por el compuesto A se define como 100 y una tasa de células reaccionadas con el compuesto para el 1% de cada población de células ("células reaccionadas con el compuesto / tasa de presencia" en la tabla, frecuencia de presencia de células positivas para IFN- γ intracelular reducidas por el compuesto A) se mostraron en la Tabla 2. Un anticuerpo anti-TCRV $\gamma\delta$ que es un reactivo obtenible se usó en el experimento para examinar células positivas para TCRV $\gamma 4$ en el cambio en expresión génica, un anticuerpo anti-CD40 que es un reactivo obtenible se usó en un experimento para examinar células positivas para CDw40 y un anticuerpo anti-IL-10R que es un reactivo obtenible se usó para examinar células positivas para IL-10R β . Como las células positivas para IL-10 no pudieron detectarse como una clara población de células, los resultados no se proporcionaron.

Tabla 2

Marcador de la superficie celular	Tasa de presencia (%)	Células reaccionadas con compuesto (%)	Células reaccionadas con compuesto / Tasa de presencia
CD40	9,14	24,3	2,7
CD49d	16,4	39,6	2,4
TCRV $\gamma\delta$	5,39	23,8	4,4
CD4	45,7	55,6	0,8
TCRV $\beta 3$	100	0	0
CD3	92,1	103,4	1,1
CD40L en CD3	3,94	3,3	0,8
CD81 en CD3	4,67	51,7	11,1
IL-10R en CD3	*	*	*

5 A partir de los resultados en la Tabla 2 se ha encontrado que las células CD3 (=linfocitos T) son todas de poblaciones de células sobre las que actúa el compuesto A (las células reactivas con compuesto en la tabla son el 103,4% en el marcador de la superficie celular CD3). Se ha encontrado adicionalmente que las células positivas para CD81 de células positivas para CD3 contienen poblaciones de células en las que el IFN- γ intracelular es el más disminuido por el compuesto A a alta frecuencia (células reaccionadas con compuesto/tasa de presencia en la tabla es 11,1 en el marcador de la superficie celular CD81 en CD3). Como el compuesto A inhibe la patogenicidad del estado patógeno de EII, las células positivas para CD3 positivas para CD81 son células por las que se desencadena el estado patógeno de las enfermedades inflamatorias del intestino. A partir de estos resultados de examen se ha aclarado que CD81 es el marcado celular patógeno del estado patógeno en linfocitos T y es un factor patógeno que produce y progresa el estado patógeno de las enfermedades inflamatorias del intestino.

Ejemplo 5

15 Efectos farmacológicos de un anticuerpo anti-CD81 en modelos de colitis de ratón inducida por TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico)

(1) Preparación de TNP-OVA

20 Se disolvieron 0,5 g de albúmina de huevo (OVA: fabricada por Sigma) y 0,5 g de K_2CO_3 (fabricado por Nacalai Tesque) en 25 ml de agua destilada para inyección (disolución de OVA). Se disolvieron 0,5 g de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS: fabricado por Nacalai Tesque) en 25 ml de K_2CO_3 0,1 M (disolución de TNBS). La disolución de OVA y la disolución de TNBS se mezclaron, y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La disolución con agitación se dializó contra $NaHCO_3$ 0,01 M (fabricado por Nacalai Tesque) a través de un dializador (membrana Spectra/Por de MWCO: 10.000 fabricada por Spectrum Medical Industries Inc.). El dializado se sometió a determinación cuantitativa de proteína con reactivo de ensayo de proteínas BCA (fabricado por Pierce).

(2) División, sensibilización, exposición y administración

35 Se inyectó (sensibilizó) subcutáneamente una emulsión 1:1 de adyuvante completo de Freund (CFA: fabricado por Difco Laboratories) y 2 mg/ml de TNP-OVA en el lomo de un ratón SJL/J de 5 semanas de edad (SJL/JorlcoCrj, macho, suministrado por Nippon Charles River) a una tasa de 0,1 ml/cabeza. En el día 7 después de la sensibilización se administraron intrarrectalmente 10 mg/ml de una disolución de etanol al 50% en TNBS (se inyectaron (expusieron) 0,2 ml/cabeza insertando una sonda en una parte de hasta 3 cm del ano) bajo anestesia con éter. En el día 5 después de la exposición, los ratones se dividieron en tres grupos que consistían cada uno en 8 ratones según el peso y la puntuación del síntoma.

40 Como los grupos, un grupo de administración de 0,1 mg (0,2 ml)/cabeza de una disolución de anticuerpo anti-CD81 (Clone: 2F7, fabricado por Southernbiotech), un grupo de control de estado patógeno de administración de 0,2 ml/cabeza de un disolvente y un grupo de administración de 200 mg/kg de sulfasalazina (SSZ: fabricada por Sigma). Con respecto a la administración, el fármaco se administró intraperitonealmente al grupo de administración de anticuerpo y el grupo de control de estado patógeno en el día de la división y en el día 2 después de la división, y SSZ se administró continuamente por vía oral una vez al día desde el día de la división. En el día 5 después de la división, el experimento se completó. La disolución de SSZ se suspendió en metilcelulosa al 0,5% (fabricada por Nacalai Tesque).

(3) Medición del peso y evaluación con puntuaciones de síntomas

Se observó el síntoma de colitis desde el día de división hasta el día 5 después de la división. El síntoma de colitis se puntuó según las condiciones de las heces [heces normales (puntuación: 0), heces sueltas (puntuación: 1) y diarrea (puntuación: 2)]. Los individuos muertos se excluyeron de los resultados. Con respecto al análisis estadístico, la comparación de múltiples grupos de round-robin del grupo de control de estado patógeno, el grupo de administración de anticuerpo anti-CD81 y el grupo de administración de SSZ se realizó por la prueba de Steel (*; 0,01 < p < 0,05, **; p < 0,01).

(4) Medición de la longitud de un intestino grueso

El día final del experimento, después de la eutanasia con una alta concentración de CO₂, se extrajo un intestino grueso y se determinó la longitud del mismo. Con respecto a la longitud del intestino grueso en cada grupo, el análisis estadístico de round-robin en el grupo de control de estado patógeno, el grupo de anticuerpo anti-CD81 y el grupo de administración de SSZ se realizó por una prueba de Dunnett después de una prueba de Bartlett (*; 0,01 < p < 0,05, **; p < 0,01).

Los resultados se mostraron en la Tabla 3. Por el anticuerpo anti-CD81, el síntoma de colitis del ratón con colitis inducida por TNBS y el acortamiento de la longitud intestinal mejoraron igualmente a aquellos por SSZ. Estos resultados han revelado que el anticuerpo anti-CD81 puede ser un agente para prevenir, mejorar o tratar las enfermedades inflamatorias del intestino.

Tabla 3

Grupo	Síntoma de colitis (D.E)	Longitud Intestinal mm (D.E)
Control del estado patógeno	1,75 (0,46)	87,8 (10,3)
Administración de anticuerpo anti-CD81	0,75 (0,76)*	98,6 (6,9)*
Administración de SSZ	0,71 (0,71)*	103,1 (8,3)**

Ejemplo 6

Cribado de un inhibidor de la expresión del gen CD81

Se incuban células Jurkat (derivadas de linfoma de linfocitos T humano), células NC-37 (derivadas de linfoblastos periféricos humanos, ATCC n° CCL-214), células CCRF-SB (derivadas de linfocitos B de leucemia linfoblástica aguda humana, ATCC n° CCL-120), células CCRF-CEM (derivadas de linfocitos T de leucemia linfoblástica aguda humana, ATCC n° CCL-119), células MOLT-3 (derivadas de linfocitos T de leucemia linfoblástica aguda humana, ATCC n° CRL-1552), células CCRF-HSB-2 (derivadas de linfocitos T de leucemia linfoblástica aguda humana, ATCC n° CCL-120,1), células IM-9 (derivadas de linfoblastos periféricos humanos, ATCC n° CCL-159), células EB-3 (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-85), células CA46 (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CRL-1648), células Daudi (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-213), células Namalwa (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CRL-1432), células Raji (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-86), células Ramos (RA1) (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-1596), células RPMI 1788 (derivadas de linfocitos periféricos humanos, ATCC n° CCL-156), células RPMI 6666 (derivadas de linfoblastos de enfermedad de Hodgkin humana, ATCC n° CCL-113), células U-937 (derivadas de linfoma histiocítico humano, ATCC n° CRL-1593), células B-ATL1 (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano), células B-ATL2 (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano), células B-ATL7 (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano), células B-ATL8 (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano), células OKM-2T (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano) o células OKM-3T (derivadas de linfocitos B de pacientes con leucemia de linfocitos T del adulto humano) (todas éstas pueden comprarse de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), o linfocitos periféricos humanos en un medio Eagle modificado por Dulbecco que contiene suero bovino fetal al 10% inactivado, glutamina 2 mM, 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin a 37°C y una concentración de CO₂ del 5%.

Las células contadas se inoculan en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos a una concentración de 0,6-1,2 x 10⁵ células/cm² y se cultivan a 37°C y una concentración de CO₂ del 5%. A estas células se añade una disolución que contiene una sustancia de prueba (disolución que contiene la sustancia de prueba a una concentración de 100 µM, 10 µM o 1 µM) en presencia de un estimulante [12-miristato-13-acetato de forbol, concanavalina, lipopolisacárido, citocinas (interferones, factor de necrosis tumoral e interleucinas), un anticuerpo anti-antígeno de superficie de linfocitos T, un anticuerpo anti-antígeno de superficie de linfocitos B o butirato). En este caso, células sin sustancia de prueba también se incuban del mismo modo como un experimento de control (control).

Las cantidades de expresión génica se analizan mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 usando ARN extraídos de estas células de cultivo. Por consiguiente, una sustancia de prueba que disminuye (inhibe o reduce) la expresión del gen CD81 el 10% o más, preferentemente el 30% o más, especialmente preferentemente el 50% o más en comparación con la cantidad de expresión en las células de control que no se ponen en contacto con una

sustancia de prueba (sustancia candidata) se selecciona como compuesto candidato que alivia o controla (mejora o trata) las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

Ejemplo 7

Cribado de un inhibidor de la función (actividad) de CD81 Para recubrir una placa de cultivo de 24 pocillos con fibronectina (Sigma), fibronectina ajustada a una concentración de 10 µg/ml con PBS se adsorbe sobre una placa de cultivo de 24 pocillos (fabricada por Falcon Labware) a 37°C durante 3 horas, y luego se lava tres veces con PBS. Linfocitos B humanos [células Daudi (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-213, fabricadas por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), células Namalwa (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CRL-1432, fabricadas por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), células Raji (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-86, fabricadas por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) y células Ramos (RA1) (derivadas de linfoma de Burkitt humano, ATCC n° CCL-1596, fabricadas por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) reaccionados con el anticuerpo anti-CD81 se lavan, luego se inoculan en una placa a una concentración de 1×10^5 células/pocillo, se incuban a 37°C durante 20 minutos, se lavan tres veces con PBS y se inmovilizan con glutaraldehído al 3%. Las células unidas a la placa se cuentan por observación con un microscopio de aproximadamente 400 x aumentos. El anticuerpo anti-CD81 puede obtenerse como un producto comercial (Pharmingen o similares).

La tasa de inhibición de la actividad de unión de fibronectina a linfocitos B por la sustancia de prueba se expresa por la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{Número de células en ausencia de una sustancia de prueba} - \text{Número de células en presencia de una sustancia de prueba}}{\text{Número de células en ausencia de una sustancia de prueba}} \right) \times 100\%$$

Una sustancia de prueba añadida a un sistema en el que la tasa de inhibición de la actividad de unión de fibronectina a linfocitos B cambia el 10% o más, preferentemente el 30% o más, especialmente preferentemente el 50% o más se selecciona como compuesto candidato para aliviar o controlar (mejorar o tratar) las enfermedades inflamatorias del intestino (EII).

Aplicabilidad industrial

La invención ha aclarado que la expresión del gen CD81 aumenta específicamente en las células patógenas para enfermedad inflamatoria del intestino (EII) en comparación con las células no patógenas para EII y que el anticuerpo anti-CD81 es eficaz para tratar las enfermedades inflamatorias del intestino.

Un agente que contiene el anticuerpo anti-CD81 como principio activo puede usarse en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino como agente terapéutico de las enfermedades inflamatorias del intestino. Además, debido a una relación de la expresión del gen CD81 y las enfermedades inflamatorias del intestino (EII), un agente candidato que puede convertirse en un agente terapéutico de las enfermedades inflamatorias del intestino puede cribarse y seleccionarse usando como índice la inhibición de la expresión del gen CD81 o la inhibición de la expresión o la función (actividad) de la proteína codificada por el gen CD81.

Además, el gen CD81 es útil como gen marcador (sonda o cebador) usado en el diagnóstico de genes de las enfermedades inflamatorias del intestino. Un gen marcador tal hace posible aclarar si la enfermedad es la enfermedad inflamatoria del intestino (mejora la precisión del diagnóstico), por lo que puede aplicarse un tratamiento más apropiado.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Procedimiento para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias del intestino que contienen como componente anticuerpos CD81

<130> 533734

<150> JP 2003-304264

<151> 28-08-2003

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 1332

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccggcccgcg ccccgcaggc cgcccgcgcg ccgcgccgcc atgggagtgg agggctgcac 60
 caagtgcata aagtacctgc tcttcgtctt caatttcgtc ttctggctgg ctggaggcgt 120
 gatcctgggt gtggcctgt ggctccgcca tgaccgcag accaccaacc tcctgtatct 180
 ggagctggga gacaagcccg cgcccacac cttctatgta ggcatctaca tcctcatcgc 240
 tgtgggcgct gtcataatgt tcgttgctt cctgggctgc tacggggcca tccaggaatc 300
 ccagtgcctg ctggggacgt tcttcacctg cctggctcgc ctgtttgcct gtgaggtggc 360
 cgccggcctc tggggctttg tcaacaagga ccagatcgc aaggatgtga agcagttcta 420
 tgaccaggcc ctacagcagg ccgtgggtga tgatgacgcc aacaacgcca aggctgtggt 480
 gaagacette cagagacgc ttgactgctg tggtccagc aactgactg ctttgaccac 540
 ctcagtgctc aagaacaatt tgtgtccctc gggcagcaac atcatcagca acctcttcaa 600
 ggaggactgc caccagaaga tcgatgacct cttctccggg aagctgtacc tcctcggcat 660
 tgctgccatc gtggtcgctg tgatcatgat cttcgagatg atcctgagca tgggtgctgtg 720
 ctgtggcctc cggaacagct ccgtgtactg aggccccgca gctctggcca caggacctc 780
 tgcagtgcc cctaagtac ccggacactt ccgagggggc catcaccgcc tgtgtatata 840
 acgtttccgg tattactctg ctacacgtag ctttttact tttggggtt tgtttttgtt 900
 ctgaactttc ctgttacctt ttcagggctg acgtcacatg taggtggcgt gtatgagtgg 960
 agacgggcct gggctcttggg gactggaggg caggggctct tctgccctgg ggtcccaggg 1020
 tgcctcgcct gctcagccag gcctctcctg ggagccactc gccagagac tcagcttggc 1080
 caacttgggg ggctgtgtcc acccagcccg cccgtcctgt gggctgcaca gctcacctg 1140
 ttccctcctg ccccggttcg agagccgagt ctgtgggcac tctctgcctt catgcacctg 1200
 tcctttctaa cacgtgcct tcaactgtaa tcacaacatc ctgactccgt catttaataa 1260
 agaaggaaca tcaggcatgc taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1320
 aaaaaaaaa aa 1332

<210> 2
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Gly Val Glu Gly Cys Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Val
 1 5 10 15

Phe Asn Phe Val Phe Trp Leu Ala Gly Gly Val Ile Leu Gly Val Ala
 20 25 30

Leu Trp Leu Arg His Asp Pro Gln Thr Thr Asn Leu Leu Tyr Leu Glu
 35 40 45

Leu Gly Asp Lys Pro Ala Pro Asn Thr Phe Tyr Val Gly Ile Tyr Ile
 50 55 60

Leu Ile Ala Val Gly Ala Val Met Met Phe Val Gly Phe Leu Gly Cys
 65 70 75 80

Tyr Gly Ala Ile Gln Glu Ser Gln Cys Leu Leu Gly Thr Phe Phe Thr
 85 90 95

Cys Leu Val Ile Leu Phe Ala Cys Glu Val Ala Ala Gly Ile Trp Gly
 100 105 110

Phe Val Asn Lys Asp Gln Ile Ala Lys Asp Val Lys Gln Phe Tyr Asp
 115 120 125

Gln Ala Leu Gln Gln Ala Val Val Asp Asp Asp Ala Asn Asn Ala Lys
 130 135 140

Ala Val Val Lys Thr Phe His Glu Thr Leu Asp Cys Cys Gly Ser Ser
 145 150 155 160

Thr Leu Thr Ala Leu Thr Thr Ser Val Leu Lys Asn Asn Leu Cys Pro
 165 170 175

Ser Gly Ser Asn Ile Ile Ser Asn Leu Phe Lys Glu Asp Cys His Gln
 180 185 190

Lys Ile Asp Asp Leu Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Leu Ile Gly Ile Ala
 195 200 205

Ala Ile Val Val Ala Val Ile Met Ile Phe Glu Met Ile Leu Ser Met

REIVINDICACIONES

1. Uso de anticuerpo anti-CD81 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir, mejorar o tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII).
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el CD81 es un CD81 de mamífero.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo anti-CD81 es un anticuerpo monoclonal.
- 10 4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa.
5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn.
- 15 6. Un anticuerpo anti-CD81 para uso en prevenir, mejorar o tratar enfermedad inflamatoria del intestino (EII).
7. El anticuerpo anti-CD81 para uso de la reivindicación 6, en el que el CD81 es un CD81 de mamífero.
- 20 8. El anticuerpo anti-CD81 para uso de la reivindicación 6 ó 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
9. El anticuerpo anti-CD81 para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa.
- 25 10. El anticuerpo anti-CD81 para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn.