

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 724**

51 Int. Cl.:

C07K 14/11 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2003 E 03793170 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 1573047**

54 Título: **Composiciones de lectina y procedimientos para modular una respuesta inmunitaria a un antígeno**

30 Prioridad:

20.08.2002 US 224661

20.08.2002 US 404823 P

15.07.2003 US 487407 P

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

06.02.2014

73 Titular/es:

**OPSANITX LLC (100.0%)
555 Main Street Suite 500
Racine WI 53403, US**

72 Inventor/es:

**SEGAL, ANDREW H. y
YOUNG, ELIHU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 724 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

Composiciones de lectina y procedimientos para modular una respuesta inmunitaria a un antígeno

Antecedentes de la invención

5 Normalmente, la modulación específica de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto requiere la administración de otra sustancia, por ejemplo, un adyuvante, en mezcla con el antígeno con el fin de iniciar y/o dirigir la modulación. Aunque los adyuvantes tradicionales tienen varias debilidades. Por ejemplo, muchos son preparaciones heterogéneas en bruto. Además, muchos son inmunomoduladores relativamente débiles, y algunos producen inflamación local grave que es inaceptable en seres humanos. Los polipéptidos solubles purificados, tales como citocinas, tienen algunas ventajas con respecto a los adyuvantes en bruto, pero su valor está limitado debido a que difunden del antígeno tras la administración. Aunque ciertas moléculas de la superficie celular pueden ser posibles inmunomoduladores como componentes de vacunas basadas en células, su aplicación generalmente implica transferencia génica en las células, que es frecuentemente problemático.

10 Por tanto, la invención satisface las necesidades sin cumplir hasta la fecha, proporcionando moléculas que pueden unirse a antígeno que llevan dianas, tales como células, virus y antígenos aislados, y que pueden servir de inmunomoduladores cuando se administran con una diana que lleva antígeno. Además, la invención proporciona composiciones que comprenden estas moléculas y procedimientos relacionados. Las composiciones y procedimientos de la invención también son útiles para otras aplicaciones, por ejemplo, cualquier aplicación en la que se desea unir un efector biológico, tal como un ligando de polipéptido para un receptor de la superficie celular, a una estructura diana, tal como un virus o una célula.

15 Operschall y col., (2000) Intervirology 43, 4-6 p322-330 describen una vacuna de ADN que codifica hemaglutinina del virus de la gripe coadministrada con un plásmido que codifica GM-CSF.

Descripción resumida de la invención

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

25 Se describe una molécula multifuncional, por ejemplo, un polipéptido de fusión, que comprende una primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda parte que puede unirse a una célula. La primera parte puede ser un primer resto de unión a la superficie celular y la segunda parte puede ser un segundo resto de unión a superficie celular. El primer resto de unión a la superficie celular puede unirse a un virus o célula, por ejemplo, una célula tumoral, que comprende un antígeno. El segundo resto de unión a la superficie celular puede unirse a un polipéptido de la superficie celular, por ejemplo, un polipéptido de no inmunoglobulina, de una célula presentadora de antígeno (APC). Así, la molécula multifuncional puede servir de puente o enlace entre una diana que lleva antígeno y una APC.

30 Como se usa en la presente memoria, una "diana que lleva antígeno" es una entidad que comprende un antígeno. Como se usa en la presente memoria, una "diana que lleva antígeno" incluye, por ejemplo, una célula completa que expresa un antígeno, una fracción de célula que comprende un antígeno, una fracción de membrana que comprende un antígeno, un virus que comprende un antígeno, una partícula viral que comprende un antígeno, o un antígeno, por ejemplo, un antígeno de polipéptido, que puede estar libre de cualquier otro material derivado de célula o derivado de virus. Las fracciones celulares pueden prepararse usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia tales como aquellos enseñados en Cell Biology A Laboratory Handbook (Academic Press 1994 Editor J. E. Celis ISBN 0-12-164715-3).

35 El término "antígeno" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula contra la que un sujeto puede iniciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula biológica que incluye, por ejemplo, metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos y hormonas, además de macromoléculas tales como hidratos de carbono complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Categorías comunes de antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, protozoos y otros antígenos parasitarios, antígenos de tumor, antígenos que participan en enfermedad autoinmunitaria, alergia y rechazo de injerto, y otros diversos antígenos. En las composiciones de la invención se prefiere que el antígeno sea un polipéptido, por ejemplo, uno que comprende al menos siete aminoácidos.

40 Como se usa en la presente memoria, "célula presentadora de antígeno" o "APC" se refiere a células que ingieren y presentan antígeno a linfocitos T. Estas células incluyen leucocitos fagocíticos, macrófagos y células dendríticas, linfocitos B y células endoteliales. Una "APC profesional" es una APC que puede activar constitutivamente un linfocito T. Las APC profesionales normalmente expresan constitutivamente moléculas de histocompatibilidad mayor de clase II y moléculas coestimulantes tales como B7-1 y/o B7-2.

45 Se describe una molécula multifuncional, la primera parte de la cual es una lectina. Así, la molécula multifuncional puede unirse a uno o más hidratos de carbono de una diana que lleva antígeno. La primera parte de la molécula multifuncional puede ser una lectina y la segunda porción puede ser un ligando para una proteína de la superficie celular (por ejemplo, un ligando para un receptor de la superficie celular). Preferentemente, la proteína de la

superficie celular es un receptor de la superficie celular de una APC. Ligandos para un receptor de la superficie celular incluyen cualquier ligando que se unirá a una proteína de la superficie celular, y preferentemente incluyen, pero no se limitan a, una opsonina, citocina, molécula de adhesión, contrarreceptor de una molécula coestimulante de linfocitos T, una defensina, un ligando para una molécula de CD40, o una proteína de choque térmico, o una porción de cualquiera de estos ligandos, que incluye aproximadamente (o al menos aproximadamente) 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 100 ó 120 aminoácidos contiguos de un ligando tal. Preferentemente, la molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes comprende una secuencia de aminoácidos que puede unirse a una proteína de la superficie celular (por ejemplo, un receptor de la superficie celular) que incluye, pero no se limita a, una molécula de adhesión, una molécula coestimulante para un linfocito T, o un receptor para al menos uno de los siguientes tipos de moléculas: una citocina, una defensina, una proteína de choque térmico, una molécula de CD40 o una opsonina.

Una proteína de la superficie celular (por ejemplo, un receptor de la superficie celular) puede ser cualquier molécula de la superficie celular que pueda unirse a la porción de ligando de una molécula multifuncional de la invención. El receptor de la superficie celular puede ser una molécula de CD40, una molécula coestimulante de linfocitos T, una molécula de adhesión, o un receptor para una citocina, una defensina, una proteína de choque térmico, una opsonina o una molécula de adhesión. Proteínas de la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de la superficie celular identificadas por el número de acceso de GenBank en el Apéndice I y II del documento WO2004/018698, o aquellas moléculas de la superficie celular que están codificadas por una molécula de ácido nucleico identificada por el número de acceso de GenBank en el Apéndice I o II del documento WO2004/018698.

El término "citocina" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de polipéptido que es naturalmente secretada por células de mamífero y que se une a una proteína de la superficie celular sobre un leucocito, induciendo un cambio (por ejemplo, un cambio en el estado proliferativo, un cambio en el perfil transcripcional o un cambio en la propensión a migrar) en el leucocito (distinto de la mera ocupación de los receptores de leucocitos para la citocina). "Cambio" se refiere a un aumento o disminución de al menos aproximadamente el 5% con respecto a en ausencia de una citocina. El término "citocina" también se refiere en la presente memoria a una molécula de polipéptido que es un ligando para un receptor para una citocina que se produce naturalmente.

Ejemplos de citocinas incluyen las siguientes: GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, ligandos para receptores de hematopoyetina, ligandos para receptores de la superfamilia de la inmunoglobulina, ligandos para receptores de interferón, ligandos para receptores de TNF y ligandos para receptores de quimiocinas. Un anticuerpo contra un receptor de citocina también puede ser una citocina.

Una citocina comprendida por una composición descrita en la presente memoria puede promover una respuesta inmunitaria Th1, es decir, la generación de linfocitos T que expresan citocinas Th1 tales como IL-2 y IFN- γ . Una citocina comprendida por una composición descrita en la presente memoria puede promover una respuesta inmunitaria Th2, es decir, la generación de linfocitos T que expresan citocinas Th2 tales como IL-4 e IL-10.

"Citocinas manipuladas" como se describe en la presente memoria son citocinas que comprenden un resto de unión a la superficie celular heterólogo.

El término "opsonina" como se usa en la presente memoria se refiere a moléculas que se producen naturalmente y que no se producen naturalmente que pueden, debido a que se unen o asocian contemporáneamente a tanto una célula que contiene antígeno como una célula presentadora de antígeno (APC), actuar de enlace o agente de acoplamiento (un adaptador) entre el antígeno y la APC para permitir unión más eficaz, engullición e internalización de la célula que contiene antígeno por la APC. Una opsonina también incluye opsoninas que no se producen naturalmente que pueden unirse a APC mediante receptores que pueden unirse a opsoninas que se producen naturalmente.

El término "opsonina" como se usa en la presente memoria también puede referirse a moléculas que pueden procesarse de forma que al menos un producto de la etapa o etapas de procesamiento pueda, debido a que se une o asocia contemporáneamente a tanto una célula que contiene antígeno como una APC, actuar de enlace o agente de acoplamiento para permitir unión más eficaz, engullición e internalización de otras células que contienen antígeno por la APC. Una opsonina también puede ser cualquier cadena de polipéptidos de una opsonina de múltiples cadenas.

Ejemplos de opsoninas que son útiles en los procedimientos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen las siguientes: vitronectina, fibronectina, componentes del complemento tales como C1q (incluyendo cualquiera de sus cadenas de polipéptidos componentes A, B y C), fragmentos del complemento tales como C3d, C3b y C4b, proteína de unión a manosa, conglutinina, proteínas tensioactivas A y D, proteína C reactiva (CRP), alfa-2-macroglobulina e inmunoglobulinas, por ejemplo, la porción Fc de una inmunoglobulina.

"Opsoninas innatas" son opsoninas del sistema inmunitario innato y se conocen en la técnica como moléculas secretadas por polipéptidos del sistema inmunitario innato y se cree que se unen contemporáneamente a un antígeno y a la superficie de una APC. Así pueden actuar de "puentes" y se cree, debido a esta propiedad, que

5 promueven la internalización de antígenos por APC. El modo en el que las opsoninas se unen a antígenos varía entre opsoninas, y puede ser covalentemente o no covalentemente. En general, los restos de unión a antígeno de opsoninas innatas se diferencian de los restos de unión a antígeno de inmunoglobulinas en que los primeros son relativamente invariantes entre miembros de la misma especie, y no experimentan diversificación durante la ontogenia de un individuo.

Una molécula que contiene un resto de unión a APC que se produce naturalmente debe considerarse una opsonina si contiene un resto mediante el cual puede unirse establemente o asociarse a una célula de forma que el resto de unión a APC se localice en el espacio extracelular, tanto si la molécula de opsonina contiene como si no su dominio de unión a antígeno natural.

10 "Opsoninas manipuladas", como se describe en la presente memoria, incluye moléculas en las que un resto de unión a la superficie celular está sustituido por el dominio de unión a antígeno natural de una opsonina o en las que un resto de unión a la superficie celular está ligado a la opsonina sin modificación o eliminación del dominio de unión a antígeno natural de la opsonina.

15 Un "resto de unión a superficie celular" es un resto mediante el cual una molécula puede unirse establemente a una superficie celular, por ejemplo, una pared celular, una cápsula de polisacárido, o el componente de lípido o proteína de una membrana plasmática, o a la superficie de un virus. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, restos de reticulación y restos de lípidos. Se prefiere que el resto de unión a la superficie celular se una a una célula por un medio distinto de interacción de un polipéptido con su polipéptido relacionado de la superficie celular. Se prefiere adicionalmente que el resto de unión a la superficie celular comprenda un resto de no polipéptido. Un resto de lípido
20 puede ligarse a la molécula manipulada mediante un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El lípido puede comprender un ácido graso, por ejemplo, palmitato. El resto de unión a la superficie celular puede ligarse a una opsonina o una opsonina de dominio truncado de unión a antígeno en el extremo de unión a antígeno de la opsonina. La molécula multifuncional puede comprender una porción idiotípica de una inmunoglobulina que puede unirse a una APC. Preferentemente, la opsonina de una célula potenciada por opsonina es una de proteína de unión
25 a C3b de cadena alfa o a manosa.

Si la opsonina es un fragmento de C3, se prefiere que se una a CR1 con una mayor afinidad que a CR2. Se prefiere adicionalmente que el fragmento de C3 no sea un ligando para CR2. Preferentemente, la opsonina no es ni C3bi, C3d ni C3dg.

30 Se prefiere que las opsoninas se unan a receptores que desencadenan fagocitosis y que son no clonotípicos y así no varían de célula a célula como lo hacen, por ejemplo, los receptores clonotípicos. Los receptores no clonotípicos están presentes sobre células que desempeñan una función en inmunidad innata e incluyen, por ejemplo, receptores no idiotípicos. Ejemplos de tales receptores incluyen el receptor CR1, CR2, CR3, CR4 y C1q, receptores que contienen un componente del receptor C1q, receptores de colectina, receptores para $\alpha 2m$, receptores para CRP y receptores de Fc para inmunoglobulinas.

35 "Exógeno" se refiere a algo que se introduce de o se produce fuera de la célula.

"Endógeno" se refiere a algo que se expresa o está presente naturalmente en una célula.

"Heterólogo" se refiere a algo que no se expresa naturalmente en una célula.

40 Preferentemente, la molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes puede unirse, mediante la segunda parte, a la superficie o membrana plasmática de una célula presentadora de antígeno (APC), es decir, una célula que puede presentar antígeno a un linfocito T, por ejemplo, una célula que puede activar un linfocito T, al menos en parte presentando antígeno al linfocito T. La APC puede ser un leucocito, por ejemplo, una célula de linaje monocítico y/o una célula dendrítica. Preferentemente, la unión de la molécula multifuncional es independiente de la expresión de un idiotipo, por ejemplo, un determinante clonotípico de una inmunoglobulina, sobre la APC. Lo más preferentemente, la molécula multifuncional comprende un primer extremo que puede unirse a una célula que
45 comprende un antígeno y un segundo extremo que puede unirse a una APC.

La molécula multifuncional puede unirse a una célula que lleva antígeno diana, por ejemplo, insertando en la porción de lípido de una membrana celular o uniendo a una estructura, por ejemplo, un polipéptido o un hidrato de carbono, que se asocia físicamente a la porción de lípido de la membrana. La estructura no necesita estar directamente en contacto con la porción de lípido de la membrana, pero puede estar indirectamente asociada, por ejemplo, a hidrato
50 de carbono que es parte de una glicoproteína de la superficie celular. Preferentemente, la molécula multifuncional puede unirse mediante una primera parte a una diana que lleva antígeno, preferentemente una célula de mamífero que comprende un antígeno, y mediante una segunda parte a una APC. También se describe el uso de una molécula que puede unirse mediante una primera parte a un virus o a una célula de no mamífero, por ejemplo, una célula fúngica o bacteriana, y mediante una segunda parte a una APC. En los últimos casos, la primera parte puede
55 unirse, por ejemplo, a un componente de una pared celular o una cápsula.

La molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes puede comprender una primera parte que comprende una lectina y una segunda parte que puede unirse a un leucocito, por ejemplo, una APC, por ejemplo

una célula de linaje monocítico o una célula dendrítica (que puede ser ella misma de linaje monocítico). Una "lectina", según la invención, es una molécula o parte de una molécula, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, que puede unirse a un hidrato de carbono, por ejemplo, un polisacárido. Familias de lectinas que se producen naturalmente incluyen:

- 5 1) Galectinas, una familia de rápido crecimiento de lectinas animales. Todas ellas comparten especificidad por galactosa.
- 2) Lectinas animales dependientes de calcio (tipo C), una familia extremadamente grande compuesta por miembros que tienen diversas estructuras y funciones.
- 10 3) Entre esta familia de lectinas de tipo C, las selectinas forman una subfamilia distinguible por su función específica en la adhesión de leucocitos a células endoteliales mediante el reconocimiento de sialil-LewisX.
- 4) Colectinas, otra subfamilia de lectinas de tipo C específica para manosa, que tienen una estructura única que consiste en un dominio de lectina tipo C y un dominio similar a colágeno. Participan en inmunidad innata.
- 15 5) Los invertebrados son conocidos por contener diversas lectinas en sus fluidos corporales, probablemente como factores de protección del cuerpo. Recientemente se encontró que algunas lectinas de un equinodermo mostraban actividad hemolítica.
- 6) Anexasinas, un grupo de proteínas que tienen afinidad por lípidos que se mostró recientemente que eran lectinas que muestran unión a glicosaminoglicanos.
- 7) La familia de las lectinas de legumbre, que consiste en un gran número de miembros, tales como ConA, con especificidad por sacáridos variable comparable a lectinas de tipo C.
- 20 8) Ricina, la primera lectina investigada en Rusia hace más de 100 años. Ahora es evidente que la familia de la ricina tiene muchos otros miembros homólogos que se diferencian en tanto la toxicidad como las especificidades de unión a azúcar.

25 Así, una molécula multifuncional de la invención puede unirse a uno o más hidratos de carbono. Los hidratos de carbono con los que las lectinas pueden unirse también incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono que comprenden lactosa, D-manosa, D-glucosa, D-fucosa, L-fucosa (por ejemplo alfa-L-fucosa), D-galactosa, oligosacáridos del grupo sanguíneo A, oligosacáridos del grupo sanguíneo B, sacáridos que comprenden alfa-D-Gal(1->3)[alfa-Lfuc(1->2)]-beta-D-Gal(1->3/4-beta-D-GlcNAc, sacáridos que comprenden alfa-sialil [2->3]-lactosa, glicoconjugados de alfa-D-manosilo, alfa-NeuNAc-[2->6]-Gal, alfa-NeuNAc-[2->6]-GalNAc, alfa-NeuNAc-[2->3]-Gal, N-acetil-beta-D-glucosamina, residuos de alfa-D-galactosilo terminales, residuos de beta-D-galactosilo terminales, N-acetil-lactosamina, residuos de alfa-D-manosilo terminales, N-acetil-beta-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina terminal, ácido N-acetilneuramínico y residuos de alfa-D-galactosaminilo terminales.

35 La molécula multifuncional que comprende una lectina puede comprender, por ejemplo, toda una lectina que se produce naturalmente o una porción de una lectina que se produce naturalmente, por ejemplo, aproximadamente (o al menos aproximadamente) 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 100 ó 120 aminoácidos contiguos de una lectina de polipéptido que se produce naturalmente. En una realización, la molécula multifuncional comprende un dominio de unión a hidrato de carbono de una lectina que se produce naturalmente, es decir, una porción de una lectina que puede unirse a un hidrato de carbono en ausencia del resto de la lectina. En otra realización, la lectina puede ser que no se produzca naturalmente, por ejemplo, se identifique de una biblioteca de moléculas artificial o se diseñe modificando la estructura de una lectina que se produce naturalmente.

40 Lectinas conocidas como "hemaglutininas" se unen a hidratos de carbono sobre eritrocitos, por ejemplo, antígenos de grupos sanguíneos, y cuando se incuban con estas células hacen que se agreguen. La hemaglutinina del virus de la gripe, por ejemplo, se une a ácido siálico (como la hemaglutinina/neuraminidasa del virus paragripal humano 3). Hay al menos 15 subtipos de hemaglutinina de la gripe conocidos, definidos por sus distintas propiedades antigénicas. Cualquiera de estos subtipos, designados, por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, 45 H12, H13, H14 y H15, puede proporcionar secuencias de aminoácidos útiles en las composiciones y procedimientos de la invención. En una realización de la invención, la hemaglutinina es de un subtipo de un virus que infecta seres humanos, por ejemplo, H1, H2, o H3. En otra realización, la hemaglutinina es de un subtipo de un virus que no infecta seres humanos, por ejemplo, uno de H4 a H15. Las secuencias de aminoácidos pueden variar hasta aproximadamente el 20% para hemaglutininas de la gripe dentro de un subtipo dado, y pueden variar entre 50 aproximadamente el 30% y aproximadamente el 70% para hemaglutininas de la gripe de diferentes subtipos.

55 La hemaglutinina de la gripe se expresa como una cadena de polipéptidos individual, designada HA0, que se trimeriza postraduccionalmente. HA0 se escinde proteolíticamente dando dos dominios, HA1 y HA2, que se unen por disulfuro entre sí. HA1 comprende actividad de unión de ácido siálico significativa, mientras que HA2 está anclada a la membrana viral y facilita la fusión de esta membrana con una membrana de célula huésped. En realizaciones preferidas de la invención, la molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de HA1.

La molécula puede ser un polipéptido de fusión que comprende uno o más aminoácidos interpuestos entre la primera y segunda partes que se unen a células, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda secuencia de aminoácidos que puede unirse a un leucocito, y que comprende además al menos un aminoácido interpuesto entre la primera y segunda partes. Los aminoácidos interpuestos pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de ligador prevista para reducir el impedimento estérico u otras interacciones no deseables entre la primera y segunda partes anteriormente mencionadas. Por ejemplo, un tipo tal de secuencia toma la forma $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n$. Ligadores útiles adicionales incluyen, pero no se limitan a, $(\text{Arg-Ala-Arg-Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Val-Ala-Thr})_{1-5}$ (Xu y col., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 151-156), $(\text{Gly-Ser})_n$ (Shao y col., 2000, Bioconjug. Chem. 11: 822-826), $(\text{Pro})_n$ (Kroon y col., 2000, Eur. J. Biochem. 267: 6740-6752), $(\text{Gly-Gly-Gly})_n$ (Kluczyk y col., 2000, Peptides 21: 1411-1420) y $(\text{Glu-Lys})_n$ (Klyczyk y col., 2000, arriba) en la cual n es 1 a 15 (cada una de las referencias precedentes también se incorpora en la presente memoria por referencia). En otra realización no se interponen aminoácidos entre la primera y segunda partes.

También se describe una molécula de ácido nucleico, preferentemente una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido multifuncional. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN, ARN, ADNc o ARNm. La molécula de ácido nucleico puede producirse naturalmente o puede sintetizarse parcialmente o completamente usando técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una primera secuencia de aminoácidos que puede unirse a una diana que lleva antígeno, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una segunda secuencia de aminoácidos que puede unirse a un receptor de la superficie celular sobre una APC.

La presente invención todavía proporciona además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido multifuncional de la invención, por ejemplo, un vector de expresión adecuado para expresión en una célula huésped, en el cual la célula huésped es preferentemente una célula eucariota, más preferentemente una célula animal, más preferentemente una célula de mamífero, y todavía más preferentemente una célula humana. En otra realización preferida, la célula huésped es una célula de levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la molécula multifuncional de la presente invención. Preferentemente, la célula huésped es una célula eucariota, tal como una célula de levadura o una célula animal, preferentemente una célula humana. La célula huésped también puede ser una célula procarionta.

También se describe una molécula, por ejemplo, un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de fusión, que comprende una primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno, por ejemplo, una célula, por ejemplo, una célula que comprende un antígeno, y una segunda parte que puede unirse a una célula, por ejemplo, un leucocito, por ejemplo, una APC. La molécula puede tener cualquiera de las características enseñadas en las descripciones de procedimientos y composiciones en la presente memoria. Preferentemente, la primera y segunda partes son heterólogas entre sí. La molécula puede ser, por ejemplo, un polipéptido recombinante expresado en una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de planta, una célula de levadura o una célula bacteriana.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria en un animal que comprende la etapa de expresar en un animal, por ejemplo, expresar en una célula huésped del animal, una molécula multifuncional de la invención, por ejemplo, un polipéptido que comprende una primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda parte que puede unirse a una célula. "Expresar en un animal" significa "hacer que esté presente en un animal". Si la molécula es un polipéptido, se expresa preferentemente introduciendo en la célula huésped, *in vivo* o *ex vivo*, un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Si el ácido nucleico se introduce en la célula huésped *ex vivo*, la célula huésped puede administrarse posteriormente al animal. El procedimiento puede comprender además administrar al animal el antígeno con el que se modula la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, el antígeno puede administrarse al animal como parte de una composición que comprende además un ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. El antígeno puede ya estar presente en el animal en el momento de expresar la molécula multifuncional. El antígeno puede administrarse al animal después de la administración de la molécula multifuncional. El antígeno puede expresarse en el animal, por ejemplo, administrando al animal una composición que comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno, tanto antes como después de la expresión de la molécula multifuncional en el animal. Secuencias de ácidos nucleicos que codifican la molécula multifuncional y el antígeno pueden introducirse en una o más células huésped del animal, por ejemplo, administrando al animal una composición que comprende aquellas secuencias de ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente memoria, el término "modular una respuesta inmunitaria" para un antígeno seleccionado usando las composiciones de la invención significa hacer la respuesta más o menos eficaz, más o menos rápida, de mayor o menor magnitud y/o más o menos fácilmente inducida que la respuesta obtenida de la administración de una composición que es idéntica en todos los aspectos, excepto que no comprende una molécula multifuncional de la invención. En una realización preferida, la respuesta es entre aproximadamente el 5 y el 100%, o preferentemente entre aproximadamente el 5 y el 50%, o más preferentemente entre aproximadamente el 5 y el 25% más o menos eficaz, más o menos rápida, de mayor o menor magnitud y/o más o menos fácilmente inducida que la respuesta

obtenida de la administración de una composición que es idéntica en todos los aspectos, excepto que no comprende una molécula multifuncional.

5 El término “modular la respuesta inmunitaria” puede referirse a estimulación/activación de una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado, o puede referirse a supresión, eliminación o atenuación de una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado. En una realización preferida, modular la respuesta inmunitaria produce estimulación/activación de una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado por aproximadamente al menos el 5%, o preferentemente entre el 5 y el 50%, o más preferentemente entre el 50 y el 100%, con respecto a una respuesta inmunitaria en ausencia de vacunación, o puede producir supresión, eliminación o atenuación de una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado por aproximadamente al menos el 5%, o preferentemente entre el 5 y el 50%, o más preferentemente entre el 50 y el 100%, con respecto a una respuesta inmunitaria en ausencia de vacunación. En algunos casos, una respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, una respuesta Th1) puede aumentarse mientras que otra respuesta inmunitaria al mismo antígeno (por ejemplo, una respuesta Th2) puede disminuirse.

15 También se describe una composición que comprende una molécula multifuncional y diana que lleva antígeno, por ejemplo, un virus, un prión o una célula. Preferentemente, si la diana que lleva antígeno es una célula, la molécula multifuncional es exógena a la célula. La molécula multifuncional puede ser heteróloga a la célula. La molécula multifuncional puede expresarse dentro de la célula, por ejemplo, de un ácido nucleico recombinante dentro de la célula. También se describe una célula que comprende un ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. La molécula multifuncional puede tener cualquiera de las características expuestas en la presente memoria. Una diana que lleva antígeno (por ejemplo, una célula) puede incluir, por ejemplo, células malignas, células tumorales benignas, linfocitos, por ejemplo, linfocitos B o T que pueden ser patógenos y/o autorreactivos, células que expresan un antígeno de una molécula de ácido nucleico exógenamente introducida, células eucariotas tales como células de mamífero, células humanas, fibroblastos, células de insecto y fúngicas, y células procariotas tales como células bacterianas. Ejemplos de virus incluyen, por ejemplo, retrovirus tales como virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2; virus del herpes tales como virus del herpes simple 1 y 2, citomegalovirus, y virus de la varicela zóster; virus del papiloma humano; virus de la rabia; rotavirus; virus de la gripe A, B, y C; virus de la hepatitis A, B, C y E o agente delta; adenovirus; virus del sarampión; virus de las paperas; virus de la poliomielitis; virus de la rubeola; virus paragripales; virus de Coxsackie A y B; virus de la viruela; virus de la fiebre amarilla; virus del dengue y otros virus de fiebres hemorrágicas; virus de la fiebre del Nilo occidental; virus de la encefalitis equina occidental; virus de la encefalitis equina oriental; virus de la encefalitis equina venezolana; virus de la encefalitis japonesa; rinovirus; y virus de la glosopeda. Los priones incluyen los agentes de encefalopatía espongiiforme ovina, kuru y encefalitis espongiiforme bovina. La célula, virus o prión puede atenuarse, es decir, convertirse en no patógena, por ejemplo, por destrucción, irradiación, fijación química, sometiendo a pasajes en cultivo con selección para patogenicidad reducida, o manipulación genética. Preferentemente, la composición comprende además un leucocito, por ejemplo, un monocito, una célula de linaje monocítico, un macrófago, o una célula dendrítica u otra APC.

35 Preferentemente, en las composiciones, la célula es sustancialmente incapaz de dividirse *in vitro*. “Sustancialmente incapaz de dividirse *in vitro*” significa que la célula se divide a una tasa que es inferior a aproximadamente el 50% de la tasa de división de células correspondientes que no se tratan para prevenir la división celular. En una realización preferida, la célula se divide a una tasa que es inferior a aproximadamente el 30-50% de la tasa de división de células correspondientes que no se tratan para prevenir la división celular.

40 Preferentemente, la composición está sustancialmente libre de medio de cultivo. Como se usa en la presente memoria, “medio de cultivo” se refiere a medio que se usa en cultivo celular que contiene al menos 2% de suero animal, tal como suero bovino fetal.

45 Más particularmente, la presente invención proporciona una molécula multifuncional que es un polipéptido de fusión que comprende: una lectina que comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de una hemaglutinina del virus de la gripe, y al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que se produce naturalmente.

En una realización, la lectina está en el extremo N con respecto a los aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que se produce naturalmente.

50 En una realización alternativa, la lectina está en el extremo C con respecto a los aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que se produce naturalmente.

En una realización, la lectina comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos del dominio de HA1 de una hemaglutinina del virus de la gripe.

En una realización, la lectina es el dominio de HA1 de una hemaglutinina del virus de la gripe.

55 Preferentemente, la hemaglutinina del virus de la gripe es una hemaglutinina de un virus de la gripe A. En otras realizaciones preferidas, la hemaglutinina del virus de la gripe es una hemaglutinina de un virus de la gripe B o gripe C.

En una realización, la hemaglutinina del virus de la gripe es de un subtipo de un virus que infecta seres humanos. Preferentemente, la hemaglutinina del virus de la gripe es de un subtipo H1. Todavía más preferentemente, la hemaglutinina del virus de la gripe es de la cepa PR/8/34 de la gripe A.

En una realización, la hemaglutinina del virus de la gripe es de un subtipo H2.

5 En una realización, la hemaglutinina del virus de la gripe es de un subtipo H3.

En una realización, la hemaglutinina del virus de la gripe es de un subtipo de un virus que no infecta seres humanos.

En una realización, el polipéptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos entera de una molécula de GM-CSF que se produce naturalmente.

10 Preferentemente, la molécula de CM-CSF es un GM-CSF murino. Todavía más preferentemente, la molécula de CM-CSF es un GM-CSF humano.

También se describe un procedimiento de reducción del número de metástasis, por ejemplo, metástasis tumorales, en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende la etapa de administrar al sujeto cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, una composición que comprende una molécula multifuncional o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional.

15 Normalmente, una composición tal comprenderá además un antígeno asociado a la enfermedad, o un ácido nucleico que codifica un antígeno tal. El procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de administrar una composición, modular una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad descrita en la presente memoria.

También se describe un procedimiento de reducción del número de metástasis en un animal que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende una célula que comprende un antígeno, comprendiendo dicha composición además una proteína de fusión que comprende una lectina y un ligando para una proteína de la superficie celular.

20

Como se usa en la presente memoria, una "metástasis" se refiere a un foco de enfermedad que se produce por una célula maligna u organismo infeccioso que se ha desplazado de un sitio en un huésped a un segundo sitio en el huésped (por ejemplo, de un sitio a un sitio no contiguo; por ejemplo, de un primer órgano a un segundo órgano).

25 Más específicamente, "metástasis" se refiere a un foco detectable de tumor maligno o infección que se deriva de, y se propaga de, y es distinto del sitio primario de enfermedad. Por consiguiente, "metástasis" se refiere a una pluralidad de focos tanto en un órgano individual como tejido en un sujeto, o en dos o más órganos o tejidos en un sujeto. Un "foco" como se usa en la presente memoria puede ser al menos una única célula maligna o infecciosa, o puede ser un foco detectable, que es detectable por uno o más de los procedimientos descritos en la presente memoria más adelante. Se dice que se detectan metástasis donde una metástasis puede detectarse por un experto en la materia usando uno o más de los procedimientos de ensayo descritos en la presente memoria más adelante.

30

"Reducir el número de metástasis" puede significar tanto provocarlas para que haya menos metástasis (por ejemplo, al menos el 10% menos, el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100% menos) de las esperadas (basándose el número o gravedad de las metástasis en las observaciones hechas en un conjunto (por ejemplo, más de uno) o sujetos similares que no han recibido la molécula multifuncional de la invención). En una realización, "reducir el número de metástasis" puede englobar prevenir metástasis (por ejemplo, un sujeto no desarrolla ningún foco detectable de enfermedad), por ejemplo, en un sujeto con un tumor, o provocar una o más metástasis preexistentes para que se vuelvan indetectables, por ejemplo, por técnicas de obtención de imágenes no invasivas radiológicas u otras técnicas como se describen en la presente memoria. Aquellos expertos en la materia reconocerán que una metástasis puede volverse ella misma indetectable aún cuando la cicatrización residual o fibrosis puedan ser detectables. La metástasis puede ser, por ejemplo, al hueso, cerebro, hígado, pulmón o médula espinal, o a cualquier otro órgano o tejido.

35

40

También se describe un procedimiento de reducción del número de metástasis en una población de sujetos que comprende la etapa de administrar a uno o más sujetos cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, una composición que comprende una molécula multifuncional o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. Normalmente, una composición tal comprenderá además un antígeno asociado a la enfermedad, o un ácido nucleico que codifica un antígeno tal. El procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de administrar una composición, modular una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad descrita en la presente memoria.

45

También se describe un procedimiento de reducción del tamaño de una metástasis en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, una composición que comprende una molécula multifuncional o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. Normalmente, una composición tal comprenderá además un antígeno asociado a la enfermedad, o un ácido nucleico que codifica un antígeno tal. El procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de administrar una composición, modular una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad descrita en la presente memoria. El "tamaño" de una metástasis, como se usa en la presente memoria, se refiere al área uni, bi o tridimensional englobada por una metástasis, o alternativamente, se refiere al número de células malignas o

50

55

infecciosas presentes en una metástasis. El tamaño de la metástasis, que puede medirse por visualización directa o por obtención de imágenes no invasiva, puede reducirse, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100%.

5 También se describe un procedimiento de reducción del tamaño de una metástasis en un animal que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende una célula que comprende un antígeno, comprendiendo dicha composición además una proteína de fusión que comprende una lectina y un ligando para una proteína de la superficie celular.

10 También se describe un procedimiento de reducción del tamaño promedio de metástasis en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria. El procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de administrar una composición, modular una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad descrita en la presente memoria. "Reducir el tamaño promedio de metástasis" puede significar tanto provocar que las metástasis sean más pequeñas en promedio de lo esperado, por ejemplo, previniendo que una o más de ellas crezcan al tamaño esperado, como provocar una o más metástasis preexistentes para que sean más pequeñas, disminuyendo así el tamaño medio de la metástasis. El tamaño promedio de la metástasis, que puede determinarse por visualización directa o por obtención de imágenes no invasiva, puede reducirse, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100%.

15 También se describe un procedimiento de reducción del tamaño promedio de metástasis en una población que comprende la etapa de administrar a uno o más sujetos cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, una composición que comprende una molécula multifuncional o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. El procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de administrar una composición, modular una respuesta inmunitaria o tratar una enfermedad descrita en la presente memoria.

20 La divulgación también engloba prevenir o tratar una enfermedad en un sujeto administrando al sujeto cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, una composición que comprende una molécula multifuncional o una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. Normalmente, una composición tal comprenderá además un antígeno asociado a la enfermedad, o un ácido nucleico que codifica un antígeno tal. La enfermedad puede ser, por ejemplo, un tumor benigno o maligno, una enfermedad infecciosa, una alergia o una enfermedad autoinmunitaria. "Tratar una enfermedad" significa disminuir la morbilidad o mortalidad asociada a la enfermedad en un paciente o población aquejada de la enfermedad. Por ejemplo, la supervivencia, supervivencia sin recaída o supervivencia sin enfermedad puede prolongarse, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100%, o el número de metástasis puede reducirse, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100%. Para aplicaciones preventivas, la incidencia de la enfermedad elegida como diana puede reducirse, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, y hasta al menos el 100%.

25 También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula multifuncional administrada en la etapa 1. Generalmente, las dos etapas se realizarán secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula multifuncional. El antígeno de la composición puede comprender una diana que lleva antígeno tal como una célula, una fracción de célula, un virus o una partícula viral.

30 También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula de ácido nucleico administrada en la etapa 1. De nuevo, las dos etapas se realizarán generalmente secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula de ácido nucleico puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula de ácido nucleico. La composición que está libre de la molécula de ácido nucleico puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula de ácido nucleico. El antígeno de la composición puede comprender una diana que lleva antígeno tal como una célula, una fracción de célula, un virus o una partícula viral. La molécula de ácido nucleico puede comprender un vector de expresión.

60

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula multifuncional administrada en la etapa 1. Generalmente, las dos etapas se realizarán secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula multifuncional. El antígeno de la composición puede comprender una diana que lleva antígeno tal como una célula, una fracción de célula, un virus o una partícula viral. Una o más de las moléculas de ácidos nucleicos puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula multifuncional administrada en la etapa 1. Generalmente, las dos etapas se realizarán secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula multifuncional. El antígeno de la composición puede comprender una diana que lleva antígeno tal como una célula, una fracción de célula, un virus o una partícula viral. La molécula de ácido nucleico puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula multifuncional administrada en la etapa 1. Generalmente, las dos etapas se realizarán secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula multifuncional. El antígeno de la composición puede comprender una diana que lleva antígeno tal como una célula, una fracción de célula, un virus o una partícula viral. La molécula de ácido nucleico puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que no comprende (es decir, está libre de) la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional, que se administró en la etapa 1. De nuevo, las dos etapas se realizarán generalmente secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula de ácido nucleico puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. Una o más de las moléculas de ácidos nucleicos puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional. Las moléculas multifuncionales de la etapa 1 y la etapa 2 pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, las dos etapas se realizarán generalmente secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula de ácido nucleico puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. Una o más de las moléculas de ácidos nucleicos puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, que comprende las etapas de 1) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula multifuncional y 2) administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno y que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional. Las moléculas multifuncionales de la etapa 1 y la etapa 2 pueden ser iguales o diferentes. De nuevo, las dos etapas se realizarán generalmente secuencialmente, por ejemplo, separadas al menos 1 día, o separadas al menos 1 semana, o separadas al menos 1 mes, o separadas al menos 6 meses, o separadas al menos 1 año. La composición que comprende la molécula de ácido nucleico puede administrarse al sujeto antes de la composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. La composición que está libre de la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional puede administrarse al sujeto antes de la composición que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional. Una o más de las moléculas de ácidos nucleicos puede comprender un vector de expresión.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria en un animal que comprende la etapa de administrar una composición que comprende una molécula multifuncional, por ejemplo, un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de fusión, que comprende una primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda parte que puede unirse a una célula. La composición puede comprender además un antígeno, una respuesta inmunitaria al cual se modula por la administración de la composición. El antígeno puede ser, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido recombinante), un lípido (por ejemplo, un glucolípido) o un hidrato de carbono (por ejemplo, un polisacárido o un componente de una pared celular bacteriana o fúngica). Por tanto, la composición comprende una diana que lleva antígeno, tanto si es, por ejemplo, un antígeno homogéneo como una estructura heterogénea tal como una célula o un virus. Si la diana que lleva antígeno es una célula, puede ser autóloga, singeneica, alogeneica o xenogeneica al animal. El antígeno puede ya estar presente en el animal en el momento de administrar la molécula, y/o el antígeno se administra al animal antes de la administración de la molécula. El antígeno puede administrarse al animal después de la administración de la molécula.

Preferentemente, la composición comprende moléculas multifuncionales que no están unidas a una diana que lleva antígeno. En una realización preferida, la composición comprende además una diana que lleva antígeno, por ejemplo, una célula. En una realización de la invención, la composición comprende moléculas multifuncionales, algunas de las cuales están unidas a una diana que lleva antígeno, por ejemplo, a la superficie de una célula, y algunas de las cuales son externas a y no están unidas a ninguna diana. En otra realización, la composición comprende una molécula multifuncional y comprende además una porción de una célula, por ejemplo, una fracción de membrana de una célula (es decir, una diana que lleva antígeno). En otra realización más, la composición comprende una molécula multifuncional y comprende además una multiplicidad de moléculas diferentes derivadas de una célula, como se encuentran, por ejemplo, en un lisado celular. Las células pueden lisarse, por ejemplo, por congelación y descongelación, preferentemente repetidamente. En una realización preferida, la composición está libre de células.

También se describe un procedimiento de vacunación de un mamífero para un antígeno seleccionado que comprende administrar al animal una composición de vacuna que comprende una molécula multifuncional que comprende una primera parte que es una lectina, y una segunda parte que es un ligando para una proteína de la superficie celular, por ejemplo, un receptor de la superficie celular de una APC. Preferentemente, la lectina puede unirse a una diana que lleva antígeno que comprende el antígeno.

También se describe un procedimiento de vacunación de un mamífero para un antígeno seleccionado que comprende extraer al menos una célula del mamífero, en el cual la célula comprende el antígeno, poner en contacto la célula *ex vivo* con una molécula multifuncional que comprende una primera parte que es una lectina y puede unirse a al menos una molécula de hidrato de carbono sobre la superficie celular que lleva antígeno, y una segunda parte que es un ligando para una proteína de la superficie celular de una APC, de manera que se forme un complejo de célula que lleva antígeno/molécula multifuncional; y poner el complejo de nuevo en el mamífero.

La composición puede comprender un antígeno, una respuesta inmunitaria al cual se modula por la administración de la composición.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado en un mamífero que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende una célula que comprende dicho antígeno, y una molécula multifuncional que comprende una lectina y un ligando para una proteína de la superficie celular.

También se describe un procedimiento de vacunación de un animal para un antígeno seleccionado que comprende extraer al menos una célula de dicho animal, comprendiendo la célula dicho antígeno; poner en contacto dicha célula *ex vivo* con un polipéptido de fusión que comprende una lectina y un ligando para una proteína de la superficie celular de una célula presentadora de antígeno, de manera que se forme un complejo; y poner dicho complejo de nuevo en dicho animal.

También se describe un procedimiento para yuxtaponer una APC con una diana que lleva antígeno que comprende: poner en contacto una APC y diana que lleva antígeno con una molécula multifuncional que comprende una primera parte que comprende una lectina que puede unirse a al menos un resto de hidrato de carbono sobre la diana que lleva antígeno y una segunda parte que comprende un ligando para una proteína de la superficie celular sobre la APC. Preferentemente, la molécula multifuncional se pone primero en contacto con la diana que lleva antígeno y el complejo de diana que lleva antígeno/molécula multifuncional resultante se pone posteriormente en contacto con la APC. La diana que lleva antígeno puede ser una célula de un animal que comprende un antígeno, y se pone en contacto con la molécula multifuncional *ex vivo* en condiciones que permitan la unión de la lectina a al menos un resto de hidrato de carbono de la célula. El complejo de molécula multifuncional/célula que lleva antígeno resultante se administra entonces de nuevo al animal del que se derivó la célula que lleva antígeno, en el cual puede unirse a un receptor de la superficie celular sobre una APC mediante la porción de ligando de la molécula multifuncional, yuxtaponiendo así la diana que lleva antígeno y la APC.

“Yuxtaposición” incluye, pero no se limita a, contacto físico. Una APC y diana que lleva antígeno se “yuxtaponen” entre sí si están suficientemente próximas para que la APC internalice la diana que lleva antígeno. Una APC y diana que lleva antígeno también se “yuxtaponen” si se separan no más de 20 μm , preferentemente no más de 10 μm , y todavía más preferentemente no más de 5 μm , y más preferentemente no más de 1 μm .

Como se usa en la presente memoria, “poner en contacto” se refiere a mezclar *in vitro* o *in vivo*.

También se describe un procedimiento de modulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno que comprende poner en contacto *in vitro* una diana que lleva antígeno, una molécula multifuncional de la invención y una APC y administrar la composición resultante a un sujeto. El complejo de diana que lleva antígeno/molécula multifuncional puede ponerse en contacto con una APC durante un tiempo suficiente para permitir la internalización de la diana que lleva antígeno por la APC. El complejo de diana que lleva antígeno/molécula multifuncional puede ponerse en contacto con una APC durante un tiempo que permite la internalización de menos de aproximadamente el 80%, menos de aproximadamente el 60%, menos de aproximadamente el 40%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 10%, o menos de aproximadamente el 5% de la diana que lleva antígeno por la APC. Procedimientos para determinar la cantidad de diana internalizada, por ejemplo, midiendo la cantidad restante fuera de la APC y restando de la cantidad inicial, son muy conocidos en la técnica. Preferentemente, el complejo de diana que lleva antígeno/molécula multifuncional se pone en contacto con una APC durante menos de aproximadamente 10 minutos, menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 60 minutos, menos de aproximadamente 90 minutos, menos de aproximadamente 120 minutos, o menos de aproximadamente 180 minutos.

Como se usa en la presente memoria, “tiempo suficiente para permitir la internalización” se refiere a un periodo de tiempo que es de una duración suficiente para permitir la internalización del antígeno seleccionado o antígeno que lleva diana por la APC (por ejemplo, no más de aproximadamente catorce días, o siete días, o cinco o tres días, o tan solo aproximadamente 24, 12, 6, 3, 2 ó 1 hora, o incluso tan solo aproximadamente 30, 20, 10, 5 ó 1 minuto).

También se describe un procedimiento de asociación de un ligando para un polipéptido de la superficie celular a una diana que lleva antígeno que comprende mezclar la diana que lleva antígeno con una molécula multifuncional que comprende el ligando. También se describe un procedimiento de asociación de una secuencia de aminoácidos a una diana que lleva antígeno que comprende mezclar la diana que lleva antígeno con un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos y comprende además una lectina. También se describe una composición que comprende una diana que lleva antígeno mezclada con un polipéptido de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos que no es una lectina y una segunda secuencia de aminoácidos que comprende una lectina.

También se describen procedimientos de producción de una molécula multifuncional en cada uno de los siguientes tipos de células: una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula bacteriana, una célula de insecto. Cada uno de estos procedimientos comprende la etapa de introducir un ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional en el tipo de célula representativo, como se enseña en la presente memoria más adelante.

Se describen procedimientos de detección o cuantificación de una molécula multifuncional que comprenden poner en contacto la molécula multifuncional con un anticuerpo u otro ligando que se une a la molécula multifuncional. Tales procedimientos incluyen ensayos de ELISA y citometría de flujo, como se describen en la presente memoria más adelante. Preferentemente, la molécula multifuncional que va a detectarse o cuantificarse está unida a una diana que lleva antígeno.

Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una proteína de fusión multifuncional que comprende un primer polipéptido que es una lectina y un segundo polipéptido que es un ligando de un receptor de la superficie celular de una APC puede elegir eficazmente como diana una diana que lleva antígeno, tal como una célula que lleva un antígeno de interés, para una APC, en el cual el antígeno es engullido por la APC, y se organiza un respuesta inmunitaria apropiada al antígeno por un animal al que se administra la molécula multifuncional.

Por consiguiente, se describe un procedimiento para vacunar un mamífero que comprende administrar al animal una composición de vacuna que comprende una molécula multifuncional que comprende una primera parte que es una lectina y que puede unirse a una diana que lleva el antígeno, y una segunda parte que es un ligando para una proteína de la superficie celular de una APC. El procedimiento puede comprender extraer al menos una célula del mamífero, en el cual la célula comprende el antígeno, poner en contacto la célula *ex vivo* con una molécula multifuncional que comprende una primera parte que es una lectina y puede unirse a al menos una molécula de hidrato de carbono sobre la superficie celular que lleva antígeno, y una segunda parte que es un ligando para una proteína de la superficie celular de una APC, de manera que se forme un complejo de célula que lleva antígeno/molécula multifuncional; y poner el complejo de nuevo en el mamífero.

10 Moléculas multifuncionales

Se describe una molécula multifuncional que comprende una primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda parte que es un ligando para una proteína de la superficie celular de una célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno. Preferentemente, la primera parte que puede unirse a una diana que lleva antígeno es una lectina que se une a al menos una molécula de hidrato de carbono presente sobre la diana que lleva antígeno. Preferentemente, la lectina es una hemaglutinina de la gripe y se une a residuos de ácido siálico presentes sobre la diana que lleva antígeno. El ligando de una proteína de la superficie celular de una célula presentadora de antígeno puede seleccionarse de una opsonina, una citocina, un ligando para una molécula de CD40, una molécula de adhesión, una defensina, una proteína de choque térmico, o un contrarreceptor para una molécula coestimulante de linfocitos T. Moléculas de la superficie celular que pueden actuar de receptores para la segunda parte de la molécula multifuncional incluyen moléculas de CD40 y receptores específicos para una opsonina, una citocina, una molécula de adhesión, una defensina, una proteína de choque térmico o un contrarreceptor para una molécula coestimulante de linfocitos T, y también incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de la superficie celular enumeradas en el Apéndice I y II.

Lectinas

25 La molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes puede comprender una primera parte que comprende una lectina y una segunda parte que puede unirse a un leucocito, por ejemplo, una APC, por ejemplo, una célula de linaje monocítico o una célula dendrítica (que puede ser por sí misma de linaje monocítico). Una "lectina", según la invención, es una molécula o parte de una molécula, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, que puede unirse a un hidrato de carbono, por ejemplo, un polisacárido. Familias de lectinas que se produce naturalmente incluyen:

- 1) Galectinas, una familia de rápido crecimiento de lectinas animales. Todas ellas comparten especificidad por galactosa.
- 2) Lectinas animales dependientes de calcio (tipo C), una familia extremadamente grande compuesta por miembros que tienen diversas estructuras y funciones.
- 35 3) Entre esta familia de lectinas de tipo C, las selectinas forman una subfamilia distinguible por su función específica en la adhesión de leucocitos a células endoteliales mediante el reconocimiento de sialil-LewisX.
- 4) Colectinas, otra subfamilia de lectinas de tipo C específica para manosa, que tienen una estructura única que consiste en un dominio de lectina tipo C y un dominio similar a colágeno. Participan en inmunidad innata.
- 40 5) Los invertebrados son conocidos por contener diversas lectinas en sus fluidos corporales, probablemente como factores de protección del cuerpo. Recientemente se encontró que algunas lectinas de un equinodermo mostraban actividad hemolítica.
- 6) Anexinas, un grupo de proteínas que tienen afinidad por lípidos que se mostró recientemente que eran lectinas que muestran unión a glicosaminoglicanos.
- 45 7) La familia de las lectinas de legumbre, que consiste en un gran número de miembros, tales como ConA, con especificidad por sacáridos variable comparable a lectinas de tipo C.
- 8) Ricina, la primera lectina investigada en Rusia hace más de 100 años. Ahora es evidente que la familia de la ricina tiene muchos otros miembros homólogos que se diferencian en tanto la toxicidad como las especificidades de unión a azúcar.

50 Así, una molécula multifuncional de la invención puede unirse a uno o más hidratos de carbono. Los hidratos de carbono con los que las lectinas pueden unirse también incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono que comprenden lactosa, D-manosa, D-glucosa, D-fucosa, L-fucosa (por ejemplo alfa-L-fucosa), D-galactosa, oligosacáridos del grupo sanguíneo A, oligosacáridos del grupo sanguíneo B, sacáridos que comprenden alfa-D-Gal(1->3)[alfa-Lfuc(1->2)]-beta-D-Gal(1->3/4-beta-D-GlcNAc, sacáridos que comprenden alfa-sialil-[2->3]-lactosa, glicoconjugados de alfa-D-manosilo, alfa-NeuNAc-[2->6]-Gal, alfa-NeuNAc-[2->6]-GalNAc, alfa-NeuNAc-[2->3]-Gal, N-acetil-beta-D-glucosamina, residuos de alfa-D-galactosilo terminales, residuos de beta-D-galactosilo terminales, N-acetil-

lactosamina, residuos de alfa-D-manosilo terminales, N-acetil-beta-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina terminal, ácido N-acetilneuramínico y residuos de alfa-D-galactosaminilo terminales.

5 La molécula multifuncional que comprende una lectina puede comprender, por ejemplo, toda una lectina que se produce naturalmente o una porción de una lectina que se produce naturalmente, por ejemplo, aproximadamente (o al menos aproximadamente) 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 35, 50, 60, 70, 80, 100 ó 120 aminoácidos contiguos de una lectina de polipéptido que se produce naturalmente. En una realización, la molécula multifuncional comprende un dominio de unión a hidrato de carbono de una lectina que se produce naturalmente, es decir, una porción de una lectina que puede unirse a un hidrato de carbono en ausencia del resto de la lectina. En otra realización la lectina puede ser que no se produzca naturalmente, por ejemplo, se identifique de una biblioteca de moléculas artificial o se diseñe modificando la estructura de una lectina que se produce naturalmente.

10 Lectinas conocidas como "hemaglutininas" se unen a hidratos de carbono sobre eritrocitos, por ejemplo, antígenos de grupos sanguíneos, y cuando se incuban con estas células hacen que se agreguen. La hemaglutinina del virus de la gripe, por ejemplo, se une un ácido siálico. Hay al menos 15 subtipos de hemaglutinina de la gripe conocidos, definidos por sus distintas propiedades antigénicas. Cualquiera de estos subtipos, designados, por ejemplo, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 y H15, puede proporcionar secuencias de aminoácidos útiles en las composiciones y procedimientos de la invención. En una realización de la invención, la hemaglutinina es de un subtipo de un virus que infecta seres humanos, por ejemplo, H1, H2 o H3. En otra realización, la hemaglutinina es de un subtipo de un virus que no infecta seres humanos, por ejemplo, uno de H4 a H15. Las secuencias de aminoácidos pueden variar hasta aproximadamente el 20% para hemaglutininas de la gripe dentro de un subtipo dado, y pueden variar entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 70% para hemaglutininas de la gripe de diferentes subtipos. Procedimientos para determinar la homología de secuencias de aminoácidos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias para determinar el % de identidad entre variantes de hemaglutinina (o variantes de cualquier porción de las moléculas multifuncionales divulgadas en la presente memoria) incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (Ausubel y col., 1995, Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, John Wiley & Sons), FASTA (Altschul y col., 25 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el paquete GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea.

30 Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio procedimiento de alineamiento no se basa normalmente en una comparación de pares todo o nada. En su lugar, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares basándose en similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz tal comúnmente usada es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el paquete de programas BLAST. Los programas de GCG Wisconsin generalmente usan tanto los valores por defecto públicos como una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra. Se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete de GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

35 Ventajosamente se emplea el algoritmo BLAST, con parámetros fijados a valores por defecto. El algoritmo BLAST se describe en detalle en Altschul y col., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Los parámetros de búsqueda se definen como sigue, y pueden fijarse ventajosamente a los parámetros por defecto definidos.

40 Ventajosamente, "identidad sustancial" cuando se evalúa por BLAST es equivalente a secuencias que coinciden con un valor EXPECT de al menos aproximadamente 7, preferentemente al menos aproximadamente 9, y lo más preferentemente 10 o más. El umbral por defecto para EXPECT en la búsqueda de BLAST es normalmente 10.

45 BLAST (Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos) es el algoritmo de búsqueda heurístico empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx; estos programas asignan significancia a sus hallazgos usando los procedimientos estadísticos de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7) con algunas mejoras. Los programas BLAST están confeccionados para búsqueda por similitud de secuencias, por ejemplo, para identificar homólogos con una secuencia de consulta. Para una discusión de cuestiones básicas en la búsqueda de similitud de bases de datos de secuencias véase Altschul y col., (1994) Nature Genetics 6:119-129.

50 Los cinco programas BLAST disponibles del Instituto Nacional de la Salud (NIH; Bethesda, MD) realizan las siguientes tareas: **blastp** compara una secuencia de consulta de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas; **blastn** compara una secuencia de consulta de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos; **blastx** compara los productos de traducción conceptuales de seis pautas de una secuencia de consulta de nucleótidos (ambas hebras) contra una base de datos de secuencias de proteínas; **tblastn** 55 compara una secuencia de consulta de proteínas contra una base de datos de secuencias de nucleótidos dinámicamente traducida en los seis pautas de lectura (ambas hebras); **tblastx** compara las traducciones de seis pautas de una secuencia de consulta de nucleótidos contra las traducciones de seis pautas de una base de datos de secuencias de nucleótidos.

BLAST usa los siguientes parámetros de búsqueda:

HISTOGRAM – Muestran un histograma de puntuaciones para cada búsqueda; por defecto es sí (Véase el parámetro H en el manual de BLAST).

DESCRIPTIONS – Limita el número de descripciones cortas de secuencias coincidentes informadas al número especificado; el límite por defecto es 100 descripciones (véase el parámetro V en la página del manual).

5 EXPECT – El umbral de significancia estadística para informar coincidencias contra las secuencias de la base de datos; el valor por defecto es 10, de manera que se espera que se encuentren 10 coincidencias simplemente por casualidad, según el modelo estocástico de Karlin y Altschul (1990). Si la significancia estadística atribuida a una coincidencia es mayor que el umbral de EXPECT, la coincidencia no se informará. Umbrales de EXPECT inferiores son más rigurosos, conduciendo a que se informen coincidencias de menor probabilidad. Los valores fraccionarios son aceptables (véase el parámetro E en el manual de BLAST).

10 CUTOFF – La puntuación de corte para informar pares de segmentos de alta puntuación. El valor por defecto se calcula a partir del valor EXPECT (véase anteriormente). Se informan HSP para una secuencia de la base de datos solo si la significancia estadística asignada a ellos es al menos de tan alta como si se asignaran a un único HSP que tiene una puntuación igual al valor CUTOFF. Mayores valores de CUTOFF son más rigurosos, conduciendo a que se informen coincidencias de menor probabilidad (véase el parámetro S en el manual de BLAST). Normalmente, los umbrales de significancia pueden gestionarse más intuitivamente usando EXPECT.

15 ALIGNMENTS – Limita las secuencias de la base de datos al número especificado para el que se informan pares de segmentos de alta puntuación (HSP); el límite por defecto es 50. Si ocurre que más secuencias de la base de datos satisfacen el umbral de significancia estadística para el informe (véase EXPECT y CUTOFF más adelante), solo se informan las coincidencias asignadas a la mayor significancia estadística (véase el parámetro B en el manual de BLAST).

20 MATRIX – Especifican una matriz de puntuación alternativa para BLASTP, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX. La matriz por defecto es BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992). Las elecciones alternativas válidas incluyen: PAM40, PAM120, PAM250 e IDENTITY. No están disponibles matrices de puntuación alternativas para BLASTN; el especificar la directiva MATRIX en solicitudes de BLAST devuelve una respuesta de error.

25 STRAND – Limita una búsqueda de TBLASTN a solo la hebra superior o inferior de las secuencias de la base de datos; o limita una búsqueda de BLASTN, BLASTX o TBLASTX a solo pautas de lectura sobre la hebra superior o inferior de la secuencia de consulta.

30 FILTER - Desenmascara segmentos de la secuencia de consulta que tienen baja complejidad composicional, como se ha determinado por el programa SEG de Wootton & Federhen (1993) Computers and Chemistry 17:149-163, o segmentos que consisten en repeticiones internas de corta periodicidad, como se ha determinado por el programa XNU de Clavezie & States (1993) Computers and Chemistry 17:191-201, o, para BLASTN, por el programa DUST de Tatusov y Lipman (NIH). El filtrado puede eliminar informes estadísticamente significativos, pero biológicamente poco interesantes de la salida de blast (por ejemplo, éxitos contra regiones ácidas, básicas o ricas en prolina comunes), dejando las regiones más biológicamente interesantes de la secuencia de consulta disponibles para coincidencia específica contra las secuencias de la base de datos.

35 La secuencia de baja complejidad encontrada por un programa de filtro se sustituye usando la letra "N" en la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, "NNNNNNNNNNNN") y la letra "X" en secuencias de proteínas (por ejemplo, "XXXXXXXXXX").

40 La filtración solo se aplica a la secuencia de consulta (o sus productos de traducción), no a las secuencias de la base de datos. La filtración por defecto es DUST para BLASTN, SEG para otros programas.

45 No es para nada inusual en absoluto que estén enmascaradas por SEG, XNU, o ambos, cuando se aplica a secuencias en SWISS-PROT, por lo que no debe esperarse que el filtrado proporcione siempre un efecto. Además, en algunos casos, las secuencias se enmascaran en su totalidad, que indica que debe sospecharse de la significancia estadística de cualquier coincidencia informada contra la secuencia de consulta sin filtrar.

NCBI-gi – Hace que los identificadores de NCBI gi se muestren en la salida, además del nombre de acceso y/o sitio.

Lo más preferentemente, se realizan comparaciones de secuencias usando el algoritmo de búsqueda simple BLAST proporcionado por el NIH. En algunas realizaciones de la presente invención no se usan penalizaciones por hueco cuando se determina la identidad de secuencias.

50 La hemaglutinina de la gripe se expresa como una única cadena de polipéptidos, designada HA0, que se trimeriza postraduccionalmente. HA0 se escinde proteolíticamente dando dos dominios, HA1 y HA2, que están unidos por disulfuro entre sí. HA1 comprende actividad de unión a ácido siálico significativa, mientras que HA2 está anclada a la membrana viral y facilita la fusión de esta membrana con una membrana de célula huésped. En realizaciones preferidas de la invención, la molécula multifuncional que comprende la primera y segunda partes comprende una

55 secuencia de aminoácidos de un dominio de HA1.

ES 2 441 724 T3

Ejemplos adicionales de moléculas de lectina útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas lectinas mostradas en la Tabla 1, y variantes de las mismas que tiene al menos el 50%, 70%, 90% y hasta el 99% de homología de secuencias con las secuencias de las lectinas mostradas en la Tabla 1

Tabla 1

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[1]	<u>././.</u>	Lectina intestinal de codorniz.	.	LECa.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[2]	<u>././.</u>	Lectina de corazón porcino (PHL).	.	LECa.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[3]	<u>././.</u>	Lectinas de unión a beta-galactósido hepático.	S-lectina o galectina	GLTa.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[4]	<u>././.</u>	Lectinas de unión a beta-galactósido de cerebro de mamífero.	S-lectina o galectina.	GLTa.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[5]	<u>Aaptos papillata.</u>	.	.	LECi.Ada.Pap.xx.Xxxx.
[6]	<u>Abelmoschus esculentus.</u>	.	.	LECp.Abe.Esc.xx.Xxxx.
[7]	<u>Abramis brana.</u>	.	.	LECp.Abr.Bra.xx.Xxxx.
[8]	<u>Abrus precatorius.</u>	APA; APA-A; APA-C; abrina.	Beta-trefoil lectina (APA); RIP tipo 2.	LECp.AbrPre.se.Cga1 (abrina) LECp.AbrPre.se.Cga2 (APA).
[10]	<u>Achatina fulica.</u>	Aglutinina fría de Achatina fulica; achatinina-H.	.	LECi.Ach.ful.xx.Xsi1.
[13]	<u>Actinomyces viscosus.</u>	.	.	LECf.Act.Vis.xx.Xga1.
[14]	<u>Adenia digitata.</u>	Modecina.	RIP tipo 2.	LECp.AdeDig.ro.Cga1.
[15]	<u>Adenia volksensii</u>	Volkensina.	RIP tipo 2.	LECp.AdeVol.ro.Cga1.
[16]	<u>Aegilops geniculata.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Aeg.Gen.se.Hch1
[19]	<u>Aegopodium podagraria.</u>	APA.	.	LECp.Aeg.Pod.rh.Hga1.
[20]	<u>Aeromonas salmonicida.</u>	.	.	LECb.Aer.Sal.xx.Xxxx.
[21]	<u>Afzaha africana.</u>	.	.	LECz.Afz.Afr.xx.Xxxx.
[22]	<u>Agardhiella tenera.</u>	.	.	LECz.Aga.Ten.xx.Xxxx.
[23]	<u>Agaricales.</u>	.	.	LECz.Aga.sss.xx.Xxxx.
[24]	<u>Agaricus bisporus.</u>	ABA-I, ABA-II, ABA-III, ABA-IV.	.	LECf.Aga.Bis.xx.Xga1
[25]	<u>Agaricus blazei.</u>	.	.	LECf.Aga.Bla.xx.Xxxx.
[26]	<u>Agaricus campestris.</u>	.	.	LECf.Aga.Cam.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[27]	<u>Agaricus edulis.</u>	.	.	LECf.Aga.Edu.xx.Xxxx.
[28]	<u>Agrobacterium radiobacter.</u>	.	.	LECu.Agr.Rad.xx.Xxxx.
[29]	<u>Agrocybe aegerita.</u>	.	.	LECf.Agr.Aeg.xx.Xxxx.
[30]	<u>Agropyrum repens.</u>	AREL, ARLL.	Hololectina; lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.Agr.Rep.se.Hch1 (AREL) LECp.Agr.Rep.le.Hch1 (ARLL)
[31]	<u>Aleuria aurantia</u>	.	.	LECf.Ale.Aur.xx.Xfu1
[32]	<u>Allium ascalonicum.</u>	AAA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Asc.bu.Hma1
[36]	<u>Cepa de Allium.</u>	ACA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Cep.bu.Hma1.
[37]	<u>Allium moly.</u>	AMA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Mol.bu.Hma1.
[38]	<u>Allium porrum.</u>	APA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Por.le.Hma1.
[39]	<u>Allium sativum.</u>	ASA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Sat.bu.Hma1 (ASA-I) LECp.All.Sat.bu.Hma1 (ASA-I) LECp.All.Sat.bu.Hma1 (ASA-I) LECp.All.Sat.bu.Hma1 (ASA-I) LECp.All.Sat.bu.Hma2 (ASA-II) LECp.All.Sat.le.Hma1 (ASA-III) LECp.All.Sat.ro.Hma1 (ASA-IV).
[40]	<u>Allium ursinum.</u>	AUA-I, AUA-II, AUA-III, AUA-Ir, AUA-L, AUA-Iir.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Urs.bu.Hma1 (AUA-I) LECp.All.Urs.bu.Hma2 (AUA-II) LECp.All.Urs.le.Hma1 (AUA-L) LECp.All.Urs.ro.Hma1 (AUA-Ir) LECp.All.Urs.ro.Hma2 (AUA-Iir).

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[42]	<u>Allium vineale.</u>	AVA.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.All.Vin.bu.Hma1
[43]	<u>Allomyrina dichotoma</u>	.	.	LECi.All.Dic.xx.Xxxx.
[44]	<u>Alocasia indica.</u>	.	.	LECp.Alo.Ind.tu.Hcu1.
[45]	<u>Aloe arborescens.</u>	Aloctina, AAA.	AAA: Proteínas de unión a manosa monocotiledónea Aloctina-A: u.	LECp.Alo.Arb.le.? (Aloctina-A) LECp.Alo.Arb.le.Hma1 (AAA)
[46]	<u>Amaranthus caudatus</u>	ACA, amarantina, ACL.	Beta-trefoil lectina, grupo de amarantina.	LECp.Ama.Cau.se.Hga1.
[47]	<u>Amaranthus cruentus.</u>	.	Grupo de amarantina.	LECp.Ama.Cru.se.Hga1.
[48]	<u>Amaranthus hypochondriacus.</u>	AHML, amarantina.	Grupo de amarantina.	LECp.Ama.Hyp.xx.Xgal1.
[49]	<u>Amaranthus teucocarpus.</u>	.	Grupo de amarantina.	LECp.Ama.Leu.se.Hga1.
[50]	<u>Amaranthus spinosus.</u>	ASL.	Grupo de amarantina.	LECp.Ama.Spi.se.Hga1.
[51]	<u>Amphicarpaea bracteata.</u>	ABrA.	Lectinas de legumbre.	LECp.Amp.Bra.se.Hma1.
[52]	<u>Anadara granosa.</u>	Anadarina MS.	.	LECi.Ana.Gra.xx.Xsi1.
[53]	<u>Anguilla anguilla.</u>	AAL.	.	LECi.Ang.Ang.xx.Xfu1.
[54]	<u>Anthocidaris crassispina.</u>	.	Clase de lectinas única novedosa.	LECi.Ant.Cra.xx.Xxxx.
[55]	<u>Óvulo de Anthocidaris crassispina.</u>	.	.	LECi.Ant.Cra.xx.Xxxx.
[57]	<u>Apium graveolens.</u>	.	.	LECp.Api.Gra.xx.Xxxx.
[58]	<u>Aplysia dactylomela.</u>	.	.	LECi.Apl.Dac.xx.Xxxx.
[59]	<u>Aplysia depilans.</u>	.	.	LECi.Apl.Dep.xx.Xga1.
[60]	<u>Aplysina archeria.</u>	.	.	LECu.Apl.Arc.xx.Xxxx.
[61]	<u>Arachis hypogea.</u>	PNA, GNL, MNL, PRA-I, PRA-II.	Todas las lectinas de Arachnis se clasifican como lectinas de legumbre.	LECp.Ara.Hyp.se.Hga1 (PNA) LECp.Ara.Hyp.no.Hga1 (GNL) LECp.Ara.Hyp.se.Hga1 (MNL) LECp.Ara.Hyp.se.Hga1 (PRA-I) LECp.Ara.Hyp.se.Hga1 (PRA-II).
[62]	<u>Araucaria brasiliensis.</u>	Lectina I, lectina II.	.	IECp.Ara.Bra.se.Hmg1 (Lectina I)

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
				LECp.Ara.Bra.se.Hmg2 (Lectina II).
[63]	<u>Arion empiricorum.</u>	.	.	LECi.An.Emp.xx.Xxxx.
[64]	<u>Arisaema consanguineum.</u>	ACA.	.	LECp.Ari.Con.tu.Hcu1
[65]	<u>Arisaema curvatum.</u>	ACmA.	.	LECz.Ari.Cur.tu.Heu1.
[66]	<u>Arthrobotrys oligospora.</u>	AOL.	.	LECF.Art.Oli.xx.Xxxx.
[68]	<u>Artocarpus hirsuta.</u>	.	.	LECp.Art.Hir.xx.Xxxx.
[69]	<u>Artocarpus incisa.</u>	.	.	LECp.Art.Inc.xx.Xxxx.
[70]	<u>Artocarpus integrifolia.</u>	Jacalina, AIA, KM+, artocarpina.	lectina de plantas beta- prisma, lectinas relacionadas con jacalina.	LECp.Art.Int.se.Hga1.
[71]	<u>Artocarpus lakoocha.</u>	Artocarpina, ALA-I, ALA-II.	Lectinas relacionadas con jacalina	LECp.Art.Lak.se.Hga1.
[72]	<u>Arum maculatum</u>	AMA.	Lectinas de unión a monocotiledóneas.	LECp.Aru.Mac.tu.Hma1.
[73]	<u>Ascaris lumbricoides.</u>	.	.	LECi.Asc.Lum.xx.Xxxx
[74]	<u>Asparagus officinalis.</u>	.	.	LECp.Asp.Off.xx.Xxxx.
[75]	<u>Bacillus polymyxa.</u>	.	.	LECb.Bac.Pols.xx.Xxxx
[76]	<u>Bacterioides fragilis.</u>	.	.	LECb.Bac.Fra.xx.Xxxx.
[77]	<u>Bandeiraea simplicifolia.</u>	BS-I, BS-I-A4, BS-I- B4, BS-II	.	LECp.Ban.Sim.xx.Xxxx.
[78]	<u>Basidiomycotina.</u>	.	.	LECF.Bas.Sss.xx.Xxxx.
[79]	<u>Bauhinia purpurea.</u>	BPA.	Lectina de legumbre.	LECp.Bau.Pur.se.Hga1.
[80]	<u>Bauhinia tomentosa.</u>	.	.	LECz.Bau.Tom.xx.Xxxx.
[81]	<u>Beauveria bassiana.</u>	.	.	LECF.Bea.Bas.xx.Xs1.
[82]	<u>Beta vulgaris.</u>	.	.	LECp.Bet.Vul.xx.Xxxx.
[83]	<u>Beta vulgaris.</u>	.	.	LECp.Bet.Vul.xx.Xxxx.
[84]	<u>Biomphalaria glabrata.</u>	BGL-I, BGL-II.	.	LECp.Bio.Gla.xx.Xxxx.
[85]	<u>Biomphalaria glabrata.</u>	.	.	LECi.Bio.Gla.xx.Xxxx.
[86]	<u>Birgus latro</u>	.	.	LECz.Bir.Lat.xx.Xxxx.
[87]	<u>Blaberus discoidalis.</u>	BDL1, BDL2, BDL3.	.	LECi.Bla.Dis.xx.Xxxx.
[88]	<u>Bordetella pertussis.</u>	Toxina de Pertussis 1PRT.	.	LECz.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[89]	<u>Bos taurus.</u>	Receptor de manosa 6-fosfato (1C39).	P-lectina.	LECa.Bos.Tau.xx.Xxxx.
[90]	<u>Bos taurus</u>	Conglutinina bovina.	C-lectina o colectina.	LECa.Bos.Tau.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[91]	<u>Bos taurus.</u>	Colectina-43 bovina (CL-43).	C-lectina o colectina.	Leca.Bos.Tau.xx.Xxxx.
[92]	<u>Botryllus schlosseri.</u>	.	S-lectina.	LECi.Bot.Sch.xx.Xxxx.
[93]	<u>Botrytis cinerea.</u>	.	.	LECz.Bot.Cin.xx.Xxxx.
[94]	<u>Bowringia milbraedii.</u>	BMA.	Lectinas de legumbre.	LECp.Bow.Mil.se.Hmg1.
[95]	<u>Brachypodium sylvaticum.</u>	BsYL.	Lectinas de unión a quitina.	LECp.Bra.Syl.se.Hch1.
[96]	<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	.	.	LECp.Bra.Jap.xx.Xga1.
[97]	<u>Branchiostoma lanceolatum.</u>	.	.	LECi.Bra.Lan.xx.Xxxx.
[98]	<u>Brassica campestris.</u>	.	.	LECp.Bra.Cam.xx.Xxxx.
[99]	<u>Brassica napobrassica.</u>	.	.	LECp.Bra.Nap.xx.Xxxx.
[100]	<u>Brassica napus.</u>	.	.	LECp.Bra.Nap.xx.Xxxx.
[101]	<u>Bryonia dioica.</u>	BDA.	.	LECp.Bry.Dio.tu.Hga1.
[113]	<u>Cancer antennarius.</u>	.	.	LECi.Can.Ant.xx.Xsi1.
[114]	<u>Adhesina de Candida albicans.</u>	Adhesinas.	.	LECf.Can.Alb.xx.Xfu1.
[115]	<u>Canna generalis.</u>	.	.	LECp.Can.Gen.rh.Hma1.
[116]	<u>Agglutinina de coagregación de Capnocytophaga gingivalis Actinomyces israelii.</u>	.	.	LECu.Cap.Gin.xx.Xxxx.
[117]	<u>Capsicum annum.</u>	.	.	LECp.Cap.Ann.xx.Xxxx.
[118]	<u>Caragana arborescens.</u>	CAA-I, CAA-II.	.	LECp.Car.Arb.se.Hga1 (CAA-I) LECp.Car.Arb.se.Hga2 (CAA-II).
[119]	<u>Carcharinus springeri.</u>	.	.	LECa.Car.Spr.xx.Xxxx.
[120]	<u>Carcinoscorpious rotundacauda.</u>	L10; carcinoscorpina.	.	LECi.Car.Rot.xx.Xsi1.
[121]	<u>Carica papya.</u>	.	.	LECp.Car.Pap.xx.Xxxx.
[123]	<u>Carum carvia.</u>	.	.	LECp.Car.Car.xx.Xxxx.
[124]	<u>Hemolisina de Carybdea alata.</u>	.	.	LECi.Car.Ala.xx.Xxxx.
[125]	<u>Castanea crenata.</u>	CCA.	.	LECp.Cas.Cre.xx.Xxxx.
[126]	<u>Cepaea hortensis.</u>	CHA-I.	.	LECi.Cep.Hor.xx.Xxxx.
[127]	<u>Channa punctatus.</u>	.	.	LECa.Cha.Pun.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[129]	<u>Chelidonium majus.</u>	.	.	LECp.Che.Maj.se.Hch1.
[132]	<u>Chicorium intybus.</u>	.	.	LECp.Chi.Int.xx.Xxxx.
[133]	<u>Cholla opuntia.</u>	.	.	LECp.Cho.Opu.xx.Xxxx.
[134]	<u>Cicer arietinum.</u>	CAA.	.	LECp.Cic.Ari.se.Hcu1.
[135]	<u>Cinachyrella alloclada.</u>	.	.	LECi.Cin.All.xx.Xxxx.
[136]	<u>Cinnamonum camphora.</u>	.	.	LECp.Cin.Cam.xx.Xxxx.
[137]	<u>Citrullus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Cit.Vul.xx.Xxxx.
[139]	<u>Citrus aurantium.</u>	.	.	LECp.Cit.Aur.se.Cnd1.
[140]	<u>Citrus aurantium.</u>	.	.	LECp.Cit.Aur.xx.Xxxx.
[141]	<u>Citrus medica.</u>	.	.	LECp.Cit.Med.xx.Xxxx.
[142]	<u>Cladrastis lutea.</u>	CLA-I, CLA-II.	.	LECp.Cla.Lut.ba.Hmg1 (CLA-I) LECp.Cla.Lut.ba.Hmg2 (CLA-II).
[143]	<u>Clerodendron trichotomum.</u>	CTA.	.	LECp.Cle.Tri.fr.Hga1.
[144]	<u>Clitocyba mebularis.</u>	.	.	LECf.Cli.Neb.xx.Xxxx
[145]	<u>Clivia miniata.</u>	CMA.	.	LECp.Cli.Min.le.Hma1.
[146]	<u>Clostridium botulinum.</u>	.	.	LECb.Clo.Bot.xx.Xxxx.
[147]	<u>Clostridium tetani.</u>	Toxina tetánica (1A8D).	.	LECb.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[148]	<u>Clupea harengus.</u>	.	.	LECa.Clu.Har.xx.Xxxx.
[149]	<u>Coccinia grandis.</u>	CIA.	.	LECp.Coc.Gra.fr.Hch1.
[151]	<u>Cocus nucifera.</u>	.	.	LECp.Coc.Nuc.xx.Xxxx.
[152]	<u>Codium fragilis.</u>	.	.	LECu.Cod.Fra.xx.Xxxx.
[153]	<u>Cofea arabica.</u>	.	.	LECp.Cof.Ara.xx.Xxxx.
[154]	<u>Colchicum autumnale.</u>	CAA.	.	LECp.Col.Aut.bu.Hcu1.
[155]	<u>Collybia velutipes.</u>	.	.	LECf.CoLVels.xx.Xxxx.
[156]	<u>Colocasia esculentum.</u>	CEA.	.	LECp.Col.Esc.tu.Hma1.
[157]	<u>Conger myriaster.</u>	Congerina I, congerina II.	S-lectina.	LECi.Con.Myr.xx.Xga1.
[159]	<u>Conidiobotus obscurus.</u>	.	.	LECf.Con.Obs.xx.Xga1.
[160]	<u>Coprinus cinereus.</u>	Cg1, Cg2.	Galectina.	LECf.Cop.Cin.xx.Xxxx.
[161]	<u>Hemolisina de Corbicula fluminea.</u>	.	.	LECi.Cor.Flu.xx.Xxxx.
[163]	<u>Corylus avellania.</u>	.	.	LECp.Cor.Ave.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[164]	<u>Cratylia mollis.</u>	.	.	LECz.Cra.Mol.xx.Xxxx.
[165]	<u>Crenomytilus grayanus.</u>	CGL.	.	LECi.Cre.Gra.xx.Xxxx.
[166]	<u>Crocus sativum.</u>	.	.	LECp.Cro.Sat.bu.Hma1.
[167]	<u>Crocus vernus.</u>	CVA.	.	LECp.Cro.Ver.xx.Xxxx.
[169]	<u>Crotalaria striata.</u>	.	.	LECp.Cro.Str.se.Hga1.
[170]	<u>Crotalaria aegyptica.</u>	.	.	LECz.Cro.Aeg.xx.Xxxx.
[171]	<u>Crotalaria falcata.</u>	.	.	LECz.Cro.Fal.xx.Xxxx.
[172]	<u>Crotalaria juncea.</u>	.	.	LECp.Cro.Jun.se.Hga1.
[174]	<u>Croton tiglium.</u>	.	.	LECp.Cro.Tig.se.Hcu1.
[175]	<u>Cucumaria echinata.</u>	CEL-III.	.	LECi.Cuc.Ech.xx.Xxxx.
[176]	<u>Cucumis catalupensis.</u>	.	.	LECp.Cuc.Cat.xx.Xxxx.
[177]	<u>Cucumis melo.</u>	.	.	LECp.Cuc.Mel.xx.Xch1.
[178]	<u>Cucumis sativus.</u>	.	.	LECp.Cuc.Sat.xx.Xch1.
[180]	<u>Cucurbita ficifolia.</u>	.	.	LECp.Cuc.Fic.xx.Xxxx.
[181]	<u>Cucurbita maxima.</u>	CMA, PP2.	.	LECp.Cuc.Max.ps.Hch1.
[182]	<u>Cucurbita pepe.</u>	.	.	LECp.Cuc.Pep.xx.Xxxx.
[183]	<u>Cucurbita pepo.</u>	CPA.	.	LECp.Cuc.Pep.fr.Hch1.
[184]	<u>Cucurbita sativus.</u>	.	.	LECp.Cuc.Sat.xx.Xxxx.
[185]	<u>Cydonia oblonja.</u>	.	.	LECp.Cyd.Obl.xx.Xxxx.
[186]	<u>Cymbidium hybrid.</u>	.	.	LECz.Cym.Hyb.le.Hma1.
[187]	<u>Cyphomandra betacea.</u>	.	.	LECp.Cyp.Bet.xx.Xxxx.
[188]	<u>Cytisus multiflorus.</u>	CMA-I, CMA-II.	.	LECp.Cyt.Mul.se.Hch1 (CMA-I) LECp.Cyt.Mul.se.Hfu1 (CMA-II).
[189]	<u>Cytisus scoparius.</u>	CSA-I, CSA-II, CMH-I, CMH-II.	.	LECp.Cyt.Sco.se.Hga1 (CS-I) LECp.Cyt.Sco.se.Hga2 (CS-II).
[190]	<u>Cytisus sessilifolius.</u>	.	.	LECp.Cyt.Ses.se.Hch1 (CSA-I) LECp.Cyt.Ses.se.Hga1 (CSA-II).
[191]	<u>Dacrymycetales.</u>	.	.	LECz.Dac.sss.xx.Xxxx.
[192]	<u>Dalbergia.</u>	.	.	LECz.Dal.sss.xx.Xxxx.
[193]	<u>Datura innoxia.</u>	.	.	LECp.Dat.Inn.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[194]	<u>Datura stramonium.</u>	DSA.	Lectinas de unión a quitina.	LECp.Dat.Str.se.Hch1.
[195]	<u>Daucus carota.</u>	.	.	LECp.Dau.Car.xx.Xxxx.
[196]	<u>Dendroaspis jamesoni.</u>	JML, veneno de mamba de Jameson	.	LECi.Den.Jam.xx.Xga1.
[198]	<u>Deuteromycetes.</u>	.	.	LECz.Deu.sss.xx.Xxxx.
[199]	<u>Dicolea lehmani</u>	.	.	LECz.Dio.Leh.xx.Xxxx.
[200]	<u>Dictyostelium discoideum.</u>	Discoïdina I.	.	LECu.Dic.Dis.xx.Xxxx.
[201]	<u>Dictyostelium purpureum.</u>	Purpurina.	.	LECu.Dic.Pur.xx.Xxxx.
[202]	<u>Didemnum candidum.</u>	DTL, DCL-I, DCL-II	.	LECi.Did.Sss.xx.Xga1.
[203]	<u>Dieffenbachia sequina.</u>	.	.	LECp.Dif.Seq.xx.Xxxx
[204]	<u>Dioclea grandifolia.</u>	.	Lectina de legumbre.	LECp.Dio.Gra.xx.Xxxx.
[205]	<u>Dioclea guianensis.</u>	DLL-I, DLL-II, DLL-III.	Lectina de legumbre.	LECp.Dio.Gui.xx.Xmg1.
[206]	<u>Dioclea virgata.</u>	.	Lectina de legumbre.	LECz.Dio.Vir.xx.Xxxx.
[207]	<u>Dolichos biflorus.</u>	DBA-S, DBA-R, DB-58, DB-57, DB46.	Lectina de legumbre.	LECp.Dol.Bif.se.Hga1 (DBA) LECp.Dol.Bif.pl.Hcu1 (DB58) LECp.Dol.Bif.pl.Hcu2 (DB57) LECp.Dol.Bif ro. ?ga1 (DB46).
[208]	<u>Drosophila.</u>	.	.	LECi.Dro.Meg.xx.Xxxx.
[209]	<u>Dumasia.</u>	.	.	LECz.Dum.sss.xx.Xxxx
[210]	<u>Echinocereus engelmannii.</u>	.	.	LECp.Echi Eng.xx.Xxxx.
[211]	<u>Echis multisquamatus.</u>	EMS16.	.	LECi.Ech.Mul.xx.Xxxx.
[212]	<u>Electrophorus electricus.</u>	Electrolectina.	.	LECi.Ele.Ele.xx.Xxxx.
[213]	<u>Elymus canadensis.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Ely.Can.se.Hch1.
[223]	<u>Erythrina velutina.</u>	.	.	LECp.Ery.Vel.xx.Xxxx.
[224]	<u>Escherichia coli.</u>	Adhesina FimH específica de manosa pili (1QUN).	Verotoxina-1: toxinas ribosilantes de ADP.	LECb.Ech.Col.xx.Xxxx.
[225]	<u>Euhadra callizoma.</u>	.	.	LECz.Euh.Cal.xx.Xxxx.
[226]	<u>Euphorbia characias.</u>	.	.	LECp.Eup.Sss.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[227]	<u>Euphorbia heterophylla.</u>	.	.	LECp.Eup.Het.xx.Xga1.
[228]	<u>Evonymus europaea.</u>	.	.	LECp.Evo.Eur.se.Hcu1.
[229]	<u>Falcata japonica.</u>	.	.	LECp.Fal.Jap.se.Hga1.
[230]	<u>Ficus cunia.</u>	.	.	LECp.Fic.Cun.xx.Xxxx.
[231]	<u>Flammulina veltipes.</u>	.	.	LECf.Fla.Vel.xx.Xxxx.
[232]	<u>Fomes fomentarius.</u>	.	.	LECz.Fom.Fom.xx.Xxxx.
[233]	<u>Fragaria vesca.</u>	.	.	LECp.Fra.Ves.xx.Xxxx.
[234]	<u>Fucus serratus.</u>	.	.	LECu.Fuc.Ser.xx.Xxxx.
[235]	<u>Fucus vesiculosus.</u>	.	.	LECu.Fuc.Ves.xx.Xxxx.
[236]	<u>Galactia tashiroi.</u>	.	.	LECp.Gal.Tas.se.Hga1.
[237]	<u>Galactia tenuiflora.</u>	.	.	LECp.Gal.Ten.se.Hga1.
[238]	<u>Galanthus nivalis.</u>	.	Lectina de monocotiledónea.	LECp.Gal.Niv.bu.Hma1
[239]	<u>Galleria mellonella.</u>	.	.	LECi.Gal.Mel.xx.Xxxx.
[240]	<u>Gallus gallus.</u>	GGL.	S-lectina o galectina	GLTa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[241]	<u>Gallus gallus.</u>	Lectinas hepáticas de pollo (CHL).	.	LECa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[242]	<u>Gallus gallus.</u>	Aglutininas de huevo de gallina.	.	LECa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[243]	<u>Gallus gallus</u>	Lectinas de unión a beta-galactósido de pollito.	S-lectina o galectina.	LECa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[244]	<u>Gallus gallus.</u>	Proteína de unión a manosa de suero de pollo.	C-lectina o colectina.	LECa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[245]	<u>Gallus gallus.</u>	Proteína de unión a manosa de hígado de pollo.	C-lectina o colectina.	LECa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[246]	<u>Gallus gallus</u>	Electrolectina tímica de pollo (CTE).	S-lectina o galectina.	GLTa.Gal.Gal.xx.Xxxx.
[247]	<u>Gallus gallus.</u>	Lectinas de piel embrionaria de pollito.	S-lectina o galectina.	GLTa.Gal.Gal.xx.Xxxx
[248]	<u>Genypterus blacodes.</u>	.	.	LECi.Epi.Tre.xx.Xxxx.
[249]	<u>Geodia cydonium.</u>	.	.	LECi.Geo.Cyd.xx.Xga1.
[250]	<u>Lectina superficial de Giardia lamblia.</u>	Taglina	.	LECu.Gia.Lam.xx.Xxxx.
[251]	<u>Gliricida sepium.</u>	Lectina A, lectina B	.	LECp.Gli.Sep.se.Hga1 (Lectina A) LECp.Gli.Sep.se.Hga2 (Lectina B).

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[252]	<u>Lectina de Glossina longipennis.</u>	.	.	LECi Glo.Lon.xx.Xxxx.
[253]	<u>Glycine max.</u>	SBA.	Lectina de legumbre.	LECp.Gly.Max.se.Hga1.
[254]	<u>Gonatanthus pumilus.</u>	.	.	LECz.Gon.Pum.ti.Hcul.
[256]	<u>Grateulopia filicina.</u>	.	.	LECu.Gra.Fil.xx.Xxxx.
[257]	<u>Griffithsia flosculosa.</u>	.	.	LECu.Gri.Flo.xx.Xxxx.
[258]	<u>Lectinas de Griffonia simplicifolia.</u>	GS-I-A4, GS-I-A4, GS-I-A4, GS-I-A4, GS-I-B4, GS-II, GS- IV.	Lectina de legumbre.	LECp.Gri.Sim.se.Hga1 (GS-I-A4) LECp.Gri.Sim.se.Hga2 (GS-I-B4) LECp.Gri.Sim.se.Hch1 (GS-II) LECp.Gri.Sim.se.Hful (GS IV) LECp.Gn.Sim.le Hga1 (GS-I-A4) LECp.Gri.Sim.le.Hga2 (GS I-B4) LECp.Gri.Sim.le.Hch1 (GS II) LECp.Gri.Sim.le.Hfu1 (GS-IV).
[260]	<u>Grifola frondosa.</u>	GFL.	.	LECF.Gri.Fro.xx.Xga1.
[261]	<u>Haemonchus contortus</u>	.	.	LECz.Xxx.Xxx.xx.Xxxx
[262]	<u>Halidrys siliquosa.</u>	.	.	LECu.Hal.Sil.xx.Xxxx.
[263]	<u>Halimeda opuntia.</u>	.	.	LECu.Hal.Opu.xx.Xxxx.
[264]	<u>Halocynthia pyriformis.</u>	.	.	LECi.Hal.Pyr.xx.Xxxx.
[265]	<u>Halocynthia roretzi.</u>	.	.	LECi.Hal.Ror.xx.Xga1
[266]	<u>Haynaldia villosa.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Hay.Vil.se.Hch1
[269]	<u>Helianthus annuus</u>	.	Lectinas de planta beta-prisma.	LECp.Hel Ann.xx.Xxxx
[270]	<u>Helianthus tuberosus.</u>	HTA.	Lectinas relacionadas con jacalina.	LECp.Hel.Tub.tu.Hmmm1
[271]	<u>Helicobacter pylori.</u>	HP-SAL.	.	LECb.Hel.Pyl.xx.Xxxx.
[272]	<u>Helix aspersa.</u>	.	.	LECi.Hel.Asp.xx.Xxxx.
[273]	<u>Helix pomatia.</u>	HPA.	.	LECi.Hel.Pom.xx.Xxxx.
[274]	<u>Herpetomonas.</u>	.	.	LECz.Her.xx.Xxxx.
[276]	<u>Heterantheium piliferum.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Het.Pil.se.Hch1.
[277]	<u>Heterometrus granulomanus.</u>	.	.	LECi.Het.gra.xx.Xsi1.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[279]	<u>Hevea brasiliensis.</u>	HBA, heveína.	Lectina de unión a quitina con dominio heveína.	LECp.Hev.Bra.la.Mch1.
[280]	<u>Hippeastrum hybrid.</u>	HHA.	Lectina de monocotiledónea.	LECp.Hip.Hyb.bu.Hma1.
[281]	<u>Hippopus hippopus.</u>	Tridacnina.	C-lectina.	LECi.Hip.Hip.xx.Xxxx.
[282]	<u>Hizoctonia solani.</u>	.	.	LECz.Hiz.Sol.xx.Xxxx.
[283]	<u>Hohenbuehelia serotina.</u>	.	.	LECf.Hoh.Ser.xx.Xxxx.
[284]	<u>Homarus americanus.</u>	HAA.	.	LECi.Hom.Ame.xx.Xxxx.
[285]	<u>Homo sapiens</u>	P-selectina (1KJD).	C-lectina.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[286]	<u>Homo sapiens.</u>	Proteína de unión a manosa humana (MBP) (1HUP).	C-lectina.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[287]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina anti-salmonella de moco intestinal.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[288]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectinas de membrana humana (HKML, HCCML).	.	LECh.Hom.Sap.Xxxx.
[289]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectinas de tejido sinovial humano.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[290]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectinas de placenta humana (HPL-H, HPL-BG).	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[291]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina de unión a galactósido de cerebro humano.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[292]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectinas de 14 kDa humanas.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[293]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina específica para Core humana (HCSL).	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[294]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectinas de la membrana celular.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[295]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina de macrófagos tumorocida.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xga1.
[296]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina de vertebrado asociada a tumor.	.	LECa.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[297]	<u>Homo sapiens</u>	Proteína similar a congulinina humana.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[298]	<u>Homo sapiens.</u>	Receptor de endocitosis específico para manosa.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xma1.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[299]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina de la penúltima galactosa humana.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[300]	<u>Homo sapiens.</u>	Trombospondina.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[301]	<u>Homo sapiens.</u>	Tetranectina.	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[302]	<u>Homo sapiens.</u>	Inmunorreceptor de células dendríticas humanas (DCIR).	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[303]	<u>Homo sapiens.</u>	Lectina seminal humana (HSL).	.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[304]	<u>Homo sapiens.</u>	Proteína cristalina de Charcot-Leyden (1LCL).	S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[305]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina II L-14-II (1HLC).	Proto S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[306]	<u>Homo sapiens.</u>	Proteína tensioactiva de pulmón humano (1B08).	C-lectina o colectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[307]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina III.	S-lectina quimérica o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[308]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina VII, hGal-7.	Proto S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[309]	<u>Homo sapiens.</u>	Pentraxina (1CRV).	Pentraxina, S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[310]	<u>Homo sapiens.</u>	Sialoadhesina.	I-lectina.	LECz.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[311]	<u>Homo sapiens.</u>	Componente del amiloide P del suero.	Pentraxina.	LECh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[312]	<u>Homo sapiens.</u>	E-Selectina (1ESL).	C-lectina.	SELh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[313]	<u>Homo sapiens.</u>	L-Selectina (1KJB).	C-lectina.	SELh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[314]	<u>Homo sapiens.</u>	Proteína C reactiva (1CRV).	Pentraxina, S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[315]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina XII.	S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[316]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina I.	Proto S-lectina o galectina.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[317]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina IX, ecalectina.	S-lectina o galectina de repetición en tándem.	GLTh.Hom.Sap.sr.Xxxx.
[318]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina VIII.	S-lectina o galectina de repetición en tándem.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[319]	<u>Homo sapiens.</u>	Galectina IV.	S-lectina o galectina de repetición en tándem.	GLTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[320]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-1 / beta-1.	Dominio de integrina A (o I).	INTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[321]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-2 / beta-1.	Dominio de integrina A (o I).	INTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[322]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-3 / beta-1.	Dominio de integrina A (o I).	INTh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[323]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-4 / beta-1.	Dominio de integrina A (o I).	INTh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[338]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-5 / beta-8.	Dominio de integrina A (o I).	INTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[339]	<u>Homo sapiens.</u>	Integrina alfa-4 / beta-7.	Integrina.	INTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[340]	<u>Homo sapiens.</u>	Alfa-E / beta-7.	Integrina.	INTh.Hom.Sap.xx.Xxxx.
[341]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula 1 de adhesión a célula de adresina de la mucosa (MADCAM-1).	Adresina.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[342]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula de adhesión vascular (VCAM-1).	.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[343]	<u>Homo sapiens.</u>	P-Selectina.	Selectina.	SELh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[344]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2).	Adresina?.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[345]	<u>Homo sapiens.</u>	Adresina del nodo linfático periférico (PNAd).	Adresina.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[346]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula de adhesión vascular (VAP-1).	.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[347]	<u>Homo sapiens.</u>	LFA-3.	Adresina?.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[348]	<u>Homo sapiens.</u>	Versicano.	C-lectina soluble ('Lecticanos').	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[349]	<u>Homo sapiens.</u>	Agrecano.	C-lectina soluble ('Lecticanos').	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[350]	<u>Homo sapiens.</u>	Neurocano.	C-lectina soluble ('Lecticanos').	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[351]	<u>Homo sapiens.</u>	Brevicano.	C-lectina soluble ('Lecticanos').	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[352]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina V.	Anexina.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx5.
[353]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina II.	Anexina.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx2.
[354]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina IV.	Anexina.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx4.
[355]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina I (lipocortina-1), ANX1.	Anexina.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx1.
[356]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina VII, sinexina.	.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx7.
[357]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula de adhesión a leucocitos activados (ALCAM).	.	LECh.Hom.Sapxx.
[358]	<u>Homo sapiens.</u>	E-cadherina.	.	CDHh.Hom.Sap.xx.XxxE.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[360]	<u>Homo sapiens.</u>	N-cadherina (uvomorulina).	.	CDHh.Hom.Sap.xx.XxxN.
[361]	<u>Homo sapiens.</u>	VE-cadherina (cadherina endotelial vascular).	.	CDHh.Hom.Sap.xx.XxxV1
[362]	<u>Homo sapiens.</u>	P-cadherina.	.	CDHh.Hom.Sap.xx.XxxP.
[363]	<u>Homo sapiens.</u>	Anexina XI (CAP-50).	.	ANNh.Hom.Sap.xx.Xxx9.
[364]	<u>Homo sapiens.</u>	Molécula de adhesión selectiva a células endoteliales (ESAM).	.	CDHh.Hom.Sapxxx.
[365]	<u>Homo sapiens.</u>	ELAM-1.	.	CDHh.xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[366]	<u>Homo sapiens.</u>	GMP-140.	.	CDHh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[367]	<u>Homo sapiens.</u>	Antígeno de linfocito cutáneo (CLA).	.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[369]	<u>Homo sapiens.</u>	Antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1).	.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[370]	<u>Homo sapiens.</u>	Antígeno 4 muy tardío (VLA-4).	.	LECh.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[371]	<u>Hordeum vulgare.</u>	HVA.	.	LECp.Hor.Vul.se.Hch1.
[372]	<u>Hura crepitans.</u>	HCA.	RIP tipo 2.	LECp.Hur.Cre.se.Cga1 (HCA) LECp.Hur.Cre.la.Cga1.
[373]	<u>Hygrophorus hypothejus.</u>	.	.	LECF.Hyg.Hyp.xx.Xxxx.
[374]	<u>Hypnea cervicornis.</u>	.	.	LECu.Hyp.Cer.xx.Xxxx.
[375]	<u>Hyptos suaveolens.</u>	.	.	LECz.Hyp.Sua.xx.Xxxx.
[376]	<u>Iberis amara.</u>	.	.	LECp.Ibe.Ama.xx.Xxxx.
[377]	<u>Virus de la gripe.</u>	Hemaglutinina.	Hemaglutinina.	LECV.Inf.Vir.xx.Xxxx.
[378]	<u>Ipomoea batatas.</u>	.	.	LECp.Ipo.Bat.xx.Xxxx.
[379]	<u>Iris hollandica.</u>	.	.	LECp.Iri.Hol.xx.Xxxx.
[380]	<u>Iris hybrid.</u>	IRA.	RIP tipo 2.	LECp.Iri.Hyb.bu.Cga1.
[381]	<u>Juglans regia.</u>	.	.	LECp.Jug.Reg.xx.Xxxx.
[382]	<u>Klyveromyces bulgaricus.</u>	.	.	LECz.Kly.Bul.xx.Xxxx.
[383]	<u>Kuehneromyces mutabilis.</u>	.	.	LECu.Kue.Mut.xx.Xxxx.
[384]	<u>Labiaceae origanum.</u>	.	.	LECp.Lab.Ori.xx.Xxxx.
[385]	<u>Lablab purpureus.</u>	DLA, LPA.	Lectina de legumbre.	LECp.Lab.Pur.se.Hmg1
[386]	<u>Laburnum alpinum.</u>	LAA-I, LAA-II.	Lectina de legumbre.	LECp.Lab.Alp.se.Hch1 (LAA-I)

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
				LECp.Lab.Alp.se.Hga1 (LAA-II).
[387]	<u>Laccana amethystina.</u>	.	.	LECz.Lac.Ame.xx.Xxxx
[389]	<u>Lachesis huta.</u>	BML.	.	LECi.Lac.Jut.xx.Xxxx.
[390]	<u>Lactarius deliciosus.</u>	LDL.	.	LECF.Lac.Del.xx.Xgal1.
[391]	<u>Lactarius lignyotus.</u>	.	.	LECz.Lac.Lig.xx.Xxxx.
[392]	<u>Lactuca scanole</u>	PLA-I, PLA-II.	.	LECa.Lac.Sca xx.Xxxx
[393]	<u>Laelia autumnalis.</u>	.	.	LECp.Lae.Aut.xx.Xxxx.
[394]	<u>Laetiporus sulfureus.</u>	PSL.	.	LECF.Lae.Sul.xx.Xxxx.
[395]	<u>Lathyrus cicera.</u>	LcLI, LcLII.	.	LECp.Lat.Cic.xx.Xxxx
[396]	<u>Lathyrus nissolia.</u>	.	.	LECp.Lat.Nis.xx.Xxxx.
[397]	<u>Lathyrus ochrus.</u>	LOL-I, LOL-II.	Lectina de legumbre.	LECp.Lat.Och.xx.Xxxx.
[398]	<u>Lathyrus odoratus</u>	.	.	LECp.Lat.Odo.xx.Xxxx
[399]	<u>Lathyrus silvestris.</u>	.	.	LECp.Lat.Sil.xx.Xxxx
[400]	<u>Lathyrus tuberosus.</u>	.	.	LECp.Lat.Tub.xx.Xxxx
[401]	<u>Lens culinaris</u>	LCA, LcH.	Lectinas de legumbre.	LECp.Len.Cul.se.Hmg1.
[402]	<u>Lepidium sativuum.</u>	.	.	LECp.Lep.Sat xx.Xxxx.
[403]	<u>Leptonychotes weddelli.</u>	.	.	LECz.Lep.Wed.xx.Xxxx.
[404]	<u>Leptospermum archinoides.</u>	LAA	.	LECp.Lep.Arc.xx.Xxxx.
[405]	<u>Leucojum</u>	.	.	LECz.Leu.sss.xx.Xxxx.
[406]	<u>Leucojum aestivum.</u>	LAA	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.Leu.Aes.bu.Hma1
[407]	<u>Leucojum venum</u>	LVA	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.Leu.Ver.bu.Hma1
[408]	<u>Limulus polyphemus.</u>	Limulina.	Pentraxina.	LECi.Lim.Pol.xx.Xsi1.
[409]	<u>Liocarcinus depurator.</u>	.	.	LECi.Lio.Dep.xx.Xxxx.
[410]	<u>Listeria ovata.</u>	LOA, LOMBP.	Proteínas de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.Lis.Ova.le.Hma1 (LOA) LECp.Lis.Ova.le.Mma1 (LOMBP).
[411]	<u>Litchi chinensis</u>	LCL.	.	LECp.Lit.Chi.xx.Xxxx
[412]	<u>Lonchocarpus capassa</u>	.	Lectina de legumbre.	LECp.Lon.Cap.se.Hga1
[413]	<u>Lontoms bainesii.</u>	.	Lectinas de legumbre.	LECp.LonBai.se.Hga1 LECp.Lon.Bai.ro.Hga1.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[414]	<u>Lophocereus shottii.</u>	.	.	LECp.Lop.Sho.xx.Xxxx.
[415]	<u>Lotus tetragonolobus.</u>	LTA	Lectinas de legumbre.	LECp.Lot.Tet.se.Hfu1.
[416]	<u>Luffa acutangula.</u>	LAA.	Lectinas del floema de cucurbitáceas.	LECp.Luf.Acu.fr.Hch1
[417]	<u>Lumbricus terrestris.</u>	EW29.	.	LECi.Lum.Ter.xx.Xxxx.
[418]	<u>Lycopersicon esculentum.</u>	LEA, TL, LEL	Lectinas de unión a quitina.	LECP.Lyc.Esc.fr.Hch1.
[419]	<u>Lycons aurea.</u>	.	Lectina de unión a manosa monocotiledónea.	LECp.Lyc.Aur.bu.Hma1
[420]	<u>Maackia amurensis.</u>	MALb, MAHb, MAL, MAHs.	Lectinas de legumbre.	LECp.Maa.Amu.se.Hsi1 (MAHs, MAH) LECp.Maa.Amu.se.Hsi2 (MAHs, MAH) LECp.Maa.Amu.ba.Hsi1 (MAHb) LECp.Maa.Amu.ba.Hsi1 (MALb).
[421]	<u>Machaerocereus eruca.</u>	MEA-I, MEA-II.	?	LECp.Mac.Eru.st.Hga1.
[422]	<u>Machaerocereus gummosus.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Mac.Gum.xx.Xxxx.
[423]	<u>Maclura pomifera.</u>	MPA.	Lectina de planta beta-prisma.	LECi.Mac.Pom.xx.Xxxx.
[424]	<u>Macrobdella decora.</u>	LL 1-63.	.	LECi.Mac.Dec.xx.Xxxx.
[425]	<u>Macrobrachium rosenbergii.</u>	MrL.	.	LECi.Mac.Ros.xx.Xxxx.
[426]	<u>Macrotyloma axillare.</u>	.	.	LECp.Mac.Axi.xx.Xxxx.
[427]	<u>Malus officinalis.</u>			LECp.Mal.Off.xx.Xxxx.
[428]	<u>Manduca sexta.</u>	Inmulectina.	C-lectina.	LECi.Man.Sex.xx.Xxxx.
[429]	<u>Mangifera indica.</u>	MIA.	.	LECp.Man.Ind.xx.Xxxx.
[430]	<u>Marah macrocarpus.</u>	.	.	LECp.Mar.Mac.xx.Xxxx.
[431]	<u>Marasmius oreades.</u>	.	.	LECf.Mar.Ore.xx.Xxxx.
[432]	<u>Medicago sativa.</u>	.	.	LECp.Med.Sat.xx.Xxxx.
[433]	<u>Medicago truncatula.</u>	.	.	LECp.Med.Tru.xx.Xxxx.
[434]	<u>Megabalanus rosa.</u>	.	.	LECi.Mag.Ros.xx.Xxxx.
[435]	<u>Megapitaria squalida.</u>	.	.	LECi.Meg.Squ.xx.Xxxx.
[436]	<u>Melanoleuca melaleuca.</u>	.	.	LECf.Mel.Mel.xx.Xxxx.
[437]	<u>Melastiza chateri.</u>	.	.	LECf.Mel.Cha.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[438]	<u>Mesocricetus auratus.</u>	.	Pentraxina.	LECz.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[474]	<u>Orchidaceae.</u>	.	.	LECp.Orc.Sss.xx.Xxxx.
[475]	<u>Ornithodoros moubata.</u>	Dorina-M.	.	LECi.Om.Mou.xx.Xxxx.
[476]	<u>Oryza sativa.</u>	OSA.	Lectinas de unión a quitina.	LECp.Ory.Sat.see.Hch1.
[477]	<u>Oscillatoria agardhii.</u>	.	.	LECu.Osc.Aga.xx.Xxxx.
[478]	<u>Otala lactea.</u>	.	.	LECi.Ota.Lac.xx.Xxxx.
[480]	<u>Pachydereus pringleii.</u>	.	.	LECp.Pac.Pri.se.Hch1.
[481]	<u>Pacifastacus leniusculus.</u>	.	.	LECi.Pac.Len.xx.Xxxx.
[482]	<u>Palmaria palmata.</u>	.	.	LECz.Pal.Pal.xx.Xxxx.
[483]	<u>Paracentrotus lividus.</u>	.	.	LECi.Par.Liv.xx.Xxxx.
[484]	<u>Parkia biglandulosa.</u>	.	.	LECp.Par.Big.xx.Xxxx.
[485]	<u>Parkia discolor.</u>	.	.	LECz.Par.Dis.xx.Xxxx.
[486]	<u>Parkia platycephala.</u>	.	.	LECz.Par.Pla.xx.Xxxx.
[487]	<u>Parkia speciosa.</u>	.	.	LECp.Park.Spe.xx.Xxxx.
[488]	<u>Paxillus atrotomentosus.</u>	.	.	LECz.Pax.Atr.xx.Xxxx.
[489]	<u>Paxillus panuoides.</u>	.	.	LECF.Pax.Pan.Sss.xx.Xxxx
[490]	<u>Penaeus californiensis</u>	.	.	LECp.Pen.Cal.xx.Xxxx.
[492]	<u>Penaeus stylirostris.</u>	.	.	LECi.Pen.Sty.xx.Xxxx.
[494]	<u>Penaeus vannamei.</u>	.	.	LECi.Pen.Van.xx.Xxxx.
[495]	<u>Perca fluviatilis.</u>	.	.	LECa.Per.Flu.xx.Xxxx.
[496]	<u>Persea gratissima.</u>	.	.	LECz.Per.Gra.xx.Xxxx.
[497]	<u>Persea americana.</u>	PAA.	.	LECp.Per.Ame.xx.Xxxx
[498]	<u>Petromyzon marinus.</u>	.	.	LECz.Pet.Mar.xx.Xxxx.
[499]	<u>Petrosecinum hortense.</u>	.	.	LECP.Pet.Hor.xx.Xxxx.
[500]	<u>Peziza badia.</u>	.	.	LECp.Pez.Bad.xx.Xxxx.
[501]	<u>Fago p22.</u>	Proteínas de la cola del fago P22 (1TSP).	.	LECb.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[502]	<u>Phalera flavescens.</u>	PFA.	.	LECi.Pha.Fla.xx.Xxxx.
[503]	<u>Phallus impudicus.</u>	.	.	LECF.Pha.Imp.xx.Xxxx.
[504]	<u>Phallusia namillata</u>	.	.	LECi.Pha Mam.xx.Xxxx.
[505]	<u>Phaseolus acutifolius.</u>	.	Lectinas de legumbre. Legumbre	LECp.Pha.Acu.se.Hcu1 (eritroaglutinina)

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
				LECp.Pha.Acu.se.Hcu2 (linfoaglutinina).
[506]	<u>Phaseolus aureus.</u>	.	.	LECp.Pha.Aur.xx.Xxxx.
[507]	<u>Phaseolus coccineus.</u>	PCA.	Lectina de legumbre.	LECp.Pha.Coc.se.Hcu1 (PCA) LECp.Pha.Coc.se Hcu2
[508]	<u>Phaseolus coccineus.</u>	.	.	LECp.Pha.Coc.xx.Xxxx.
[509]	<u>Phaseolus limenesis.</u>	PLA, LBA, LBL.	Lectinas de legumbre.	LECp.Pha.Lim.se.Hga1.
[510]	<u>Phaseolus lunatus.</u>	.	.	LECp.Pha.Lun.se.Xxxx.
[511]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	PHA-E, PHA-L.	Lectina de legumbre.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[512]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	GNIL, GNpL, GNsL.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[513]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	Pinto III.	.	LECa.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[514]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[515]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[516]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[517]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[518]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[519]	<u>Phaseolus vulgaris.</u>	.	.	LECp.Pha.Vul.xx.Xxxx.
[520]	<u>Phlomis fruticosa.</u>	.	.	LECz.Phl.Fru.xx.Xxxx.
[521]	<u>Pholiota aurivella.</u>	PAA.	.	LECF.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[522]	<u>Pholiota squarrosa.</u>	.	.	LECF.Pho.Squ.xx.Xxxx.
[524]	<u>Phoradendron californicum.</u>	.	.	LECz.Pjo.Cal.xx.Xxxx.
[525]	<u>Phragmites.</u>	.	.	LECz.Phr.sss.xx.Xxxx.
[526]	<u>Phragmites australis.</u>	.	.	LECp.Phr.Aus.xx.Xxxx.
[527]	<u>Physalia physalis.</u>	Fisalitoxina.	.	LECI.Phy.Phy.xx.Xxxx.
[528]	<u>Physalis angulata.</u>	PA-VII-A, PA-VII-B y PA-VII-C	.	LECz.Phy.Ang.xx.Xxxx.
[529]	<u>Physarum polycephalum.</u>	.	.	LECu.Phy.Pol.xx.Xxxx.
[530]	<u>Phytolacca americana.</u>	PWM, Pa-1, Pa-2 (PL-A), Pa-3, Pa-4 (PL-C), Pa-5.	.	LECp.Phy.Ame.ro.Hch1(P-1) LECp.Phy.Ame.ro.Hch2(P-2) LECp.Phy.Ame.ro.Hch3(P-3) LECp.Phy.Ame.ro.Hch4(P-4)

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
				LECp.Phy.Ame.ro.Hch5(P-5) LECp.Phy.Ame.ro.Hch6(P-6).
[531]	<u>Pimenta officinalis.</u>	.	.	LECp.Pim.Off.xx.Xxxx.
[532]	<u>Pisum sativum.</u>	PSA, PsA.	Lectinas de legumbre.	LECp.Pis.Sat.se.Hmg1 (PSA, PsA) LECp.Pis.Sat.ro.Hmg1
[533]	<u>Plecoglossus altivelis.</u>	PAL.	.	LECa.Ple.Alt.xx.Xxxx.
[535]	<u>Pleurocybella porrigens.</u>	.	.	LECf.Ggg.Sss.xx.Xxxx.
[536]	<u>Pleurotus ostreatus.</u>	.	.	LECf.Ple.Ost.xx.Xxxx.
[537]	<u>Plumaria elegans.</u>	.	.	LECu.Plu.Ele.xx.Xxxx.
[538]	<u>Polyandrocarya misakiensis.</u>	.	C-lectina.	LECi.Pol.Mis.xx.Xga1.
[539]	<u>Polygonum multiflorum.</u>	.	.	LECp.Pol.Mul.xx.Xxxx.
[540]	<u>Polyomavirus.</u>	1VPN.	.	LECV.Pol.Vir.xx.Xxxx.
[541]	<u>Polyporus fomentarius.</u>	.	.	LECf.Pol.Fom.xx.Xxxx.
[542]	<u>Polyporus squamosus.</u>	.	.	LECf.Pol.Squ.xx.Xxxx.
[543]	<u>Polysphondylium pallidum.</u>	.	.	LECu.Pol.Pal.xx.Xxxx.
[544]	<u>Potamon potamios.</u>	.	.	LECi Pot.Pot.xx.Xxxx.
[545]	<u>Prunus Amencana.</u>	.	.	LECp.Pru.Ame.xx.Xxxx.
[546]	<u>Prunus avium.</u>	.	.	LECp.Pru.Avi.xx.Xxxx.
[547]	<u>Psathyrostachys juncea.</u>	.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina.	LECp.Psa.Jun.se.Hch1.
[548]	<u>Pseudomonas aeruginosa.</u>	.	.	LECb.Pse.Aer.xx.Xga1.
[549]	<u>Pseudomonas aplysia.</u>	.	.	LECb.Pse.Apl.xx.Xxxx.
[550]	<u>Psophocarpus tetragonolobus.</u>	PTL-I (WBA-I), PTL-II (WBA-II), WBTL, L-1, L-II.	.	LECp.Pso.Tet.se.Hga1 (PTL-I) LECp.Pso.Tet.se.Hga2 (PTL-II) LECp.Pso.Tet.ro.Hga1 (WBTL) LECp.Pso.Tet.so.Hga2 LECp.Pso.Tet.le.Hga1 (L-1) LECp.Pso.Tet.le.Hga2 (L-II).

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[551]	<u>Ptilota serrata.</u>	.	.	LECu.Pxx.Ser.xx.Xxxx.
[552]	<u>Punica Pranatum.</u>	.	.	LECp.Pun.Gra.xx.Xxxx.
[553]	<u>Rana catesbeiana.</u>	.	Lectinas que expresan actividad de RNasa (leczimas).	LECa.Ran.Cat.xx.Xxxx.
[554]	<u>Lectina de óvulo de Rana catesbeiana.</u>	cSBL.	Lectinas que expresan actividad de RNasa (leczimas).	LECa.Ran.Cat.xx.Xxxx.
[555]	<u>Rana japonica.</u>	jSBL.	Lectinas que expresan actividad de RNasa (leczimas).	LECa.Ran.Jap.xx.Xxxx.
[557]	<u>Rana nigromaculata.</u>	.	.	LECa.Ran.Nig.xx.Xxxx.
[558]	<u>Raphanus sativus.</u>	.	.	LECp.Rap.Sat.xx.Xxxx.
[559]	<u>Ratus norvegicus.</u>	Proteína de unión a mananos (MBP-A).	C-lectina o colectina.	LECa.Rat.Nor.xx.Xxxx.
[560]	<u>Ratus ratus.</u>	Lectina de macrófagos de rata peritoneales.	.	LECa.Rat.Rat.xx.Xfu1 LECa.Rat.Rat.xx.Xga1.
[561]	<u>Ratus ratus.</u>	.	.	LECa.Rat.Rat.xx.Xxxx.
[562]	<u>Ratus ratus.</u>	Galectina II.	S-lectina o galectina.	GLT2.Rat.Rat.xx.Xxxx.
[563]	<u>Ratus ratus.</u>	Galectina IV.	S-lectina o galectina de repetición en tándem.	GLTa.Rat.Rat.xx.Xxxx.
[564]	<u>Rheum rhapontium.</u>	.	.	LECp.Rhe.Rhas.xx.Xxxx..
[565]	<u>Ribes rubrum.</u>	.	.	LECp.Rib.Rubs.xx.Xxxx.
[566]	<u>Ricinus communis.</u>	RCA-I, RCA-II, ricina.	Beta-trefoil lectina.	LECp.Ric.Com.se.Cga1 (Ricina D) LECp.Ric.Com.se.Cga2 (Ricina E) LECp.Ric.Com.se.Cga2 (RCA, RSL).
[567]	<u>Robinia pseudoacacia.</u>	RPA-I, RCA-III.	.	LECp.Rob.Pse.se.Hcu1 (RPsA-I) LECp.Rob.Pse.se.Hcu2 (RPsA-II) LECp.Rob.Pse.se.Hcu1 (RPbA-I) LECp.Rob.Pse.se.Hcu2 (RPbA-II).
[568]	<u>Rubus fruticosus</u>	RFA.	?	LECp.Rub.Fru.tc.Xga1.
[569]	<u>Rubus idaeus.</u>	.	.	LECp.Rub.Ida.xx.Xxxx.
[570]	<u>Rutilus rutilus</u>	.	.	LECV.Rut.Rut.xx.Xxxx.
[571]	<u>Salmo gairdneri.</u>	.	.	LECa.Sal.Gai.xx.Xxxx.

ES 2 441 724 T3

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[572]	<u>Salmo salar v. Atlantica.</u>	.	.	LECa.Sal.Sal.xx.Xma1.
[573]	<u>Salmo salar v. Chinook.</u>	.	.	LECa.Sal.Sal.xx.Xxxx.
[574]	<u>Salmo trutta.</u>	.	.	LECa.Sal.Tru.xx.Xxxx.
[618]	<u>Tetragonolobus pupurea.</u>	.	.	LECP.Tet.Pur.xx.Xxxx.
[619]	<u>Thermopsis.</u>	.	.	LECz.The.sss.xx.Xxxx.
[621]	<u>Toxopneustes pileolu.</u>	.	C-lectina.	LECi.Xxx.Xxx.xx.Xxxx.
[622]	<u>Trichoderma.</u>	.	.	LECF.Tri.Sss.xx.Xxxx.
[623]	<u>Tricholoma mongolicum.</u>	.	.	LECF.Tri.Mon.xx.Xxxx.
[624]	<u>Tricholomataceae 93-138.</u>	.	.	LECF.Tri.Sss.xx.Xxxx.
[625]	<u>Tricholomataceae 93-34</u>	.	.	LECz.Tri.Sss.xx.Xxxx.
[626]	<u>Trichosanthes japonica.</u>	TJA-II, TJA-I, TK-I, TK-II.	.	LECP.Tn.Jap.xx.Xxxx
[627]	<u>Trifolium repens.</u>	.	.	LECP.Tri.Rep.xx.Xxxx.
[628]	<u>Triticum aestivium.</u>	WGA.	Lectina de dominio heveína, unión a quitina lectina.	LECP.Tri.Aes.se.Hch1.
[629]	<u>Tulipa gesneriana.</u>	TGA.	.	LECP.Tul.Ges.xx.Xxxx.
[630]	<u>Udotea petiolata.</u>	.	.	LECP.Udo.Pet.xx.Xxxx.
[631]	<u>Ulex europaeus.</u>	UEA-I, UEA-II, UEA-III.	Lectina de legumbre.	LECP.Ule.Eur.xx.Xxxx.
[632]	<u>Ulva lactuca.</u>	.	.	LECU.Ulv.Lac.xx.Xxxx.
[633]	<u>Ulva laetevirens.</u>	.	.	LECU.Ulv.Lae.xx.Xxxx.
[635]	<u>Ulva rigida.</u>	.	.	LECz.Ulv.Rig.xx.Xxxx.
[637]	<u>Urtica dioica.</u>	UDA.	Lectinas de unión a quitina.	LECP.Urt.Dio.rh.Hch1.
[638]	<u>Vaejovis confuscus.</u>	.	.	LECI.Vae.Con.xx.Xxxx.
[639]	<u>Vatairea macrocarpa.</u>	VML.	.	LECP.Vat.Mac.xx.Xxxx.
[640]	<u>Vibrio alginolyticus.</u>	.	.	LECB.Vib.Alg.xx.Xch1.
[641]	<u>Vibrio cholera.</u>	VPCV; quitovibrina.	.	LECB.Vib.Cho.xx.Xxxx.
[642]	<u>Vicia cracca.</u>	.	.	LECP.Vic.Cra.xx.Xxxx.
[643]	<u>Vicia ervilia.</u>	.	.	LECP.Vic.Erv.xx.Xxxx.
[644]	<u>Vicia faba.</u>	VFA, favina.	Lectina de legumbre.	LECP.Vic.Fab.xx.Xxxx.
[645]	<u>Vicia graminea.</u>	VGA.	.	LECP.Vic.Gra.xx.Xxxx.

CLAVE	NOMBRE	ABREVIATURA	CLASE	CÓDIGO DE LECTINA
[646]	<u>Vicia hyrcanica.</u>	.	.	LECp.Vic.Hyr.xx.Xxxx.
[647]	<u>Vicia sativa.</u>	.	.	LECp.Vic.Sat.xx.Xxxx.
[648]	<u>Vicia unijuga.</u>	VUA.	.	LECp.Vic.Unj.xx.Xxxx.
[649]	<u>Vicia villosa.</u>	VVA-A4, VVL-A4.	Lectina de legumbre.	LECp.Vic.Vil.xx.Xxxx.
[650]	<u>Vigna radiata.</u>	MBL-I, MBL-II.	.	LECp.Vig.Rad.xx.Xxxx.
[651]	<u>Vigna unguiculata.</u>	.	.	LECp.Vig.Ung.xx.Xxxx.
[652]	<u>Viscum album.</u>	ML-I, ML-II, ML-III, viscumina, VisAlbCBA.	Beta-trefoil lectina (ML-I).	LECp.Vis.Alb.pl.Cga1 (ML-I, viscumina) LECp.Vis.Alb.pl.Cga2 (ML-II, viscumina) LECp.Vis.Alb.pl.Cga3 (ML-III, VAA-II) LECp.Vis.Alb.pl.Hch1 (VisAlbCBA)
[653]	<u>Vitis vinifera.</u>	.	.	LECp.Vit.Vin.xx.Xxxx
[654]	<u>Volvariella volvacea.</u>	VVL.	.	LECf.Vol.Vol.xx.Xxxx.
[655]	<u>Wistaria floribunda.</u>	WFA.	.	LECp.Wis.Flo.xx.Xxxx
[656]	<u>Wistaria floribunda.</u>	.	.	LECp.Wis.Flo.xx.Xxxx.
[657]	<u>Wistaria sinensis</u>	.	.	LECp.Wis.Sin.xx.Xxxx.
[658]	<u>Wistaria brachbotrys.</u>	.	.	LECz.Wis.Bra.xx.Xxxx.
[659]	<u>Xanthosoma sagittifolium.</u>	.	.	LECp.Xan.Sag.xx.Xxxx.
[660]	<u>Óvulo de Xenopus laevis.</u>	.	.	LECa.Xen.Lae.xx.Xgal.
[661]	<u>Xeromus chrysesteron</u>	.	.	LECz.Xer.Chr.xx.Xxxx.
[662]	<u>Xylaria polymorpha.</u>	.	.	LECf.Xyl.Pol.xx.Xxxx.
[663]	<u>Zea mays.</u>	ZMA-I, ZMA-II, ZMEA.	.	LECp.Zea.May.xx.Xxxx.
[664]	<u>Cannabis sativa.</u>	CSA.	.	LECp.CanSat.se.Glu.
[665]	<u>Smilax glabra.</u>	Zarzaparrilla.	.	LECp.SmiGla.rh.xxx.
[666]	<u>Trichosanthes anguina.</u>	Calabaza serpiente.	.	.

Los códigos de lectina toman la siguiente forma:

LLLx.Ggg.Sss.ti.TspN

Sigue una explicación de cada variable del índice.

LLL se refiere a la categoría general de aglutinina. En este momento se reconocen seis categorías generales: lectinas (LEC), integrinas (INT), cadherinas (CDH), anexinas (ANN), selectinas (SEL) y galectinas (GLT). El valor x se refiere a los grupos taxonómicos de la aglutinina, la Tabla 1 resumen estas categorías:

5

Categoría	Grupo taxonómico
-----------	------------------

LECa, GLTa	Lectina o galectina de animal superior, normalmente vertebrados.
LECh, GLTh	Lectina o galectina de seres humanos
LECi, GLTi	Lectina o galectina de invertebrados
LECP.	Lectinas de planta
LECF.	Lectina de hongos
LECu.	Lectina de organismos unicelulares
LECb.	Lectina de bacterias
LECV.	Lectinas virales

Ggg representa las tres primeras letras del nombre del género de la planta (en latín).

Sss las tres primeras letras del nombre de la especie de la planta (en latín).

ti se refiere al tejido del que se ha aislado la lectina. La Tabla 2 resume los índices usados para los diversos tejidos:

Tejido, célula u órgano	Agrupación taxonómica	Índice
Corteza	Planta	Ba
Bulbo	Planta	Bu
Membrana celular	Bacteria, unicelular	Cm
Epidermis	Humano, vertebrados	Ep
Fruto	Planta	Fr
Hemolinfa	Invertebrados	He
Látex	Planta	La
Hoja	Planta	Le
Nódulo	Planta	No
Órgano o tipo de célula	Humano, vertebrados, invertebrados	Oc
Savia de floema	Planta	Ps
Rizoma	Planta	Rh
Raíz	Planta	Ro
Semilla	Planta	Se
Suero o plasma	Humano, vertebrados, invertebrados	Sr
Esporas o cuerpos fructíferos	Hongos	Sp
Tallo	Planta	St
Tentáculos	Invertebrados	Te
Tubérculo	Planta	Tu
Homogeneizado del cuerpo entero	Invertebrados	Wb
Veneno	Invertebrados	Ve
Indefinido	Humano, vertebrados, invertebrados, bacterias	Un
	Unicelular, virus, fúngicos	

T se refiere al subtipo de lectina. Hololectinas, merolectinas, quimerolectinas y superlectinas se indican por las letras H, M, C y S, respectivamente.

sp se refiere al grupo de especificidad. Cada grupo se indica por el índice facilitado en la Tabla 3:

Especificidad	Índice de grupo
Lectinas de unión a manosa	ma
Lectinas de unión a manosa/maltosa	mm
Lectinas de unión a manosa/glucosa	mg
Lectinas de unión a GlcNAc/(GlcNAc)	ch
Lectinas de unión a Gal/GalNAc	ga
Lectinas de unión a fucosa	fu
Lectinas de unión a ácido siálico	si
Lectinas con una especificidad compleja pero conocida	co
Lectinas con una especificidad compleja y desconocida	cu
Lectinas con una especificidad dual	du
Lectinas con una especificidad indeterminada	nd

Lípidos

- 5 Una molécula multifuncional puede ser una molécula que comprende una primera parte que comprende un lípido y una segunda parte que comprende una secuencia de aminoácidos que puede unirse a una molécula de la superficie celular, por ejemplo, una molécula de la superficie celular de una APC. La unión de un lípido, por ejemplo, un ácido graso de cadena larga, a una molécula, por ejemplo, un polipéptido, puede permitir que el complejo se asocie establemente a la membrana plasmática cuando el complejo se mezcla con una célula (Nagarajan y col., 1995, J Immunol Methods 184:241-51; McHugh y col., 1995, PNAS 92:8059-63; van den Berg y col., 1995, J Cell Biol, 131:669-77). Se cree que esto se produce mediante intercalación del lípido en la membrana. Un procedimiento conveniente de producción de un polipéptido asociado a lípido comprende expresar, en una célula huésped adecuada, un ácido nucleico que codifica, en parte, una secuencia señal que dirige la adición postraduccional de un resto de GPI. Usando tecnología de ADN recombinante, una proteína no ligada a GPI naturalmente puede expresarse como una proteína ligada a GPI construyendo un ácido nucleico que codifica la proteína ligada a una secuencia señal de GPI heteróloga. La secuencias de nucleótidos que codifican secuencias señal de GPI útiles para este fin incluyen, por ejemplo, aquellas comprendidas por factor de aceleración del decaimiento (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "22" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32; secuencias que codifican las secuencias señal divulgadas en Caras y col., patente de EE.UU. 5.109.113); brevicano (por ejemplo, nt 1982-2047 del número de acceso de GenBank X86406), mesotelina (por ejemplo, nt 1858-1983 de Genbank U40434), antígeno 2 de *Coccidioides immitis* (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 172-194 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 1256444, Zhu y col., 1996, Gene 181:121-5), acetilcolinesterasa (por ejemplo, secuencias que codifican el péptido "HC" como se describe en Duval y col., 1992, EMBO J 11:3255-61 (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "19" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32)), receptores alfa y beta de folato humano (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 230-257 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 182416 o los aminoácidos 228-255 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 1655592, Yan y Ratnam, 1995, Biochemistry 34:14594-600), 5' nucleotidasa (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 547-570 ó 547-574 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 404502, Furukawa y col., 1994, Biochim Biophys Acta 1190:273-8 (por ejemplo, secuencias que codifican las secuencias de aminoácidos "5" o "6" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32)), CD59 (por ejemplo, codificado por nt 393-473 de Genbank U48255; secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "20" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32; secuencias que codifican los aminoácidos 74-101 de la Figura 2 de Powell y col., 1997, J Immunol 158:1692-1702), T-cadherina (por ejemplo, secuencias que codifican los 76 aminoácidos del extremo C de T-cadherina de pollito como se describe por Koller y Ranscht, 1996, J Biol Chem 271:30061-7), aminopeptidasa P (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 649-673 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 1517942, Hyde y col., 1996, Biochem J 319:197-201), carboxipeptidasa M, CD16B, Thy 1, anhidrasa carbónica IV (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 284-312 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 179791, Okuyama y col., 1995, Arch Biochem Biophys 320:315-22), fosfatasa alcalina placentaria (por ejemplo, secuencias que codifican los aminoácidos 498-529 de la base de datos de proteínas NCBI Entrez nº de acceso 178464, Oda y col., 1994,

Biochem J 301:577-83), glicoproteína F3 neuronal, antígeno carcinoembrionario (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "28" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), MRC-OX45 (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "2" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), RT 6.2 (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "3" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), antígeno específico de preesporas de *D. discoideum* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "4" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), dipeptidasa microsómica (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "8" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), CAMPATH-1 (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "9" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), PARP de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "10" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG Mit 118a de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "11" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG Mit 117a de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "12" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG MITat 1.1000 BC de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "13" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG MITat 1.5b de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "14" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG ILTat 1.1 de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "15" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG TxTat 1 de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "16" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG Mit 221 de *T. brucei* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "17" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), proteínas priónicas (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "18" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), receptor de urocinasa (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "21" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), VSG YNat 1.1 de *T. congolense* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "23" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), GAS-1 de *S. cerevisiae* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "24" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), Thy-1 (por ejemplo, secuencias que codifican las secuencias de aminoácidos "25" o "26" en la Tabla 1 de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), PSP de *L. major* (por ejemplo, secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos "29" en la Tabla I de Bucht y Hjalmarsson, 1996, Biochim Biophys Acta 1292:223-32), glicoproteína del sitio de contacto A de *D. discoideum* (por ejemplo, secuencias que codifican los 25 aminoácidos del extremo C como se describe en Barth y col., 1996, Biochem J 317:533-40)CD24, y secuencias sintéticas (por ejemplo, como se describe por Coyne y col., 1993, J Biol Chem 268:6689-93).

Los polipéptidos ligados a GPI pueden extraerse de células usando el siguiente procedimiento. 5×10^6 células se centrifugan y se congelan a -80°C . El sedimento se descongela en 14 ml de NaCl 0,15 M / Tris 10 mM a 7,4 / primaquina 0,1 mM / 2% de Triton X-114 con agitación a 0°C durante 1 h, luego se centrifuga a 8800 g a 0°C durante 10 min. El sobrenadante se mantiene a -20°C durante la noche, se descongela a temperatura ambiente y luego se dispone a 32°C durante 12 min. Entonces se centrifuga a 3000 g durante 3 min a 32°C . La fase superior se decanta y se añaden 11 ml de tampón A frío (NaCl 0,15 M / Tris 10 mM a 7,4 / primaquina 0,1 mM / 0,06% de Triton X-114) a la fase inferior. Ésta se incuba sobre hielo durante 10 min. Se repiten 12 min de incubación a 32°C , centrifugación a 3000 g a 32°C , decantación de la fase superior y adición de 11 ml de tampón A frío a la fase inferior. La disolución se centrifuga a 18000 g durante 10 min a 0°C . Se repiten 12 min de incubación a 32°C , centrifugación a 3000 g a 32°C y decantación de la fase superior. Se añaden 3 vol de acetona fría a la fase inferior final. La disolución se centrifuga a 12.000 rpm durante 30 min, el sobrenadante se elimina y el sedimento de proteína que contiene la fracción de GPI se seca a vacío. Pueden purificarse proteínas específicas mediante procedimientos muy conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, purificación por inmunofluorescencia.

Otro procedimiento de producción de un polipéptido ligado a lípidos es ligar químicamente el polipéptido a un ácido graso tal como palmitato. 1,5 mg/ml del polipéptido se suspenden en PBS, pH 7,8, que contiene 0,3% de ácido desoxicólico, 0,1% de bicarbonato sódico y 0,1% de azida de sodio. El pH final óptimo de la disolución es 7,6-8,0. La mezcla se calienta a 37°C y se añade el éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (Research Organics, Cleveland, OH) a una concentración final de 0,1 mg/ml. La disolución se incuba durante la noche a temperatura ambiente. El polipéptido se purifica por paso a través de una columna de cromatografía Sephadex G-75 de 16 x 250 mm equilibrada con 0,15% de ácido desoxicólico en PBS, pH 7,6.

Restos de reticulación útiles según la invención

Otro procedimiento conveniente de enlace de un ligando a una diana que lleva antígeno es usar un agente de reticulación. Un "agente de reticulación" es una entidad química que puede reaccionar con grupos funcionales en al menos otras dos moléculas, por ejemplo, dos polipéptidos o un polipéptido y un lípido, de forma que tras la reacción con el agente de reticulación las dos moléculas se hayan ligado covalentemente. Así, un ligando para CD40 puede reticularse con una molécula sobre la superficie de una célula.

En la técnica se conocen una amplia variedad de agentes de reticulación, tanto bifuncionales como polifuncionales, y

están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Sigma (St. Louis, MO). Éstos incluyen, por ejemplo, anhídrido S-acetilmercaptosuccínico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido S-acetiltioglicólico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido S-acetiltiopropiónico, dihidrazida de ácido adípico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-azidobenzoico, N-(5-azido-2-nitrobeniloxi)succinimida, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 6-(4-azido-2-nitrofenilamino)hexanoico, bromuro de p-azidofenacilo, N-(4-azidofeniltio)ftalimida, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-azidosalicílico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bromoacético, éter diglicidílico de 1,4-butanodiol, bis(L-metionina-p-nitrofeniléster) de carbonilo, éster p-nitrofenílico de ácido 2-diazo-3,3,3-trifluoropropiónico, malonimidato de dietilo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobeneno, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, adipimidato de dimetilo, 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, suberimidato de dimetilo, 4,4'-ditiobisfenilazida, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ditiobis(propiónico), éster de N-hidroxisuccinimida de ácido bis-(succínico) de etilenglicol, 4-fluoro-3-nitrofenilazida, bis-(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido p-formilbenzoico, glutaraldehído, 2-iminotiolano; éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 6-(yodoacetamido)caproico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido yodoacético, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-maleimidoacético, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-maleimidobenzoico, 4-(N-maleimido)benzofenona, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido gamma-maleimidobutírico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido épsilon-maleimidocaproico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico, éster de 3-sulfo-N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(N-maleimidometil)ciclohexanocarboxílico, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido beta-maleimidopropiónico, N,N'-bis(3-maleimidopropionil)-2-hidroxi-1,3-propanodiamina, 1,4-fenilendiisotiocianato, N,N'-o-fenilendimaleimida, N,N'-p-fenilendimaleimida, éter bis(glicidílico) de polioxietileno, bis(polioxietileno-bis(éter glicidílico)), polioxietileno-bis(imidazolilcarbonilo), bis(polioxietileno-bis(imidazolilcarbonilo)), bis(p-nitrofenilcarbonato) de polioxietileno, éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico, éster de bis(N-hidroxisuccinimida) de ácido subérico, éster de maleimidometil-N-hidroxisuccinimida de ácido succínico, 1,5-bis(succinimidooxycarbonilo)-pentano y bis(N-succinimidil)carbonato.

Ligandos de una proteína de la superficie celular

Las moléculas multifuncionales comprenden una parte que es una lectina y puede unirse a al menos una molécula de hidrato de carbono sobre una diana que lleva antígeno, y una segunda parte que comprende un ligando para una proteína de la superficie celular de una célula presentadora de antígeno. El ligando puede ser cualquier ligando que se una a una o más de las moléculas de la superficie celular indicadas por el número de acceso de GenBank en el Apéndice I o II del documento WO2004/018698. El ligando puede incluir, pero no se limita a, una opsonina, una citocina, una proteína de choque térmico, una molécula de adhesión, una defensina, o un contrarreceptor para una molécula coestimulante de linfocitos T; o una porción de cualquiera de estas moléculas, por ejemplo, aproximadamente (o al menos aproximadamente) 5, 8, 10, 12, 15, 20, 25, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 100 ó 120 residuos de aminoácidos contiguos, hasta la longitud completa de una molécula tal.

Citocinas

El término "citocina" como se define anteriormente en este documento se refiere a una molécula de polipéptido que es naturalmente secretada por células de mamífero y que se une a un receptor de la superficie celular sobre un leucocito. El término "citocina" también se refiere en la presente memoria a una molécula de polipéptido que es un ligando para un receptor para una citocina que se produce naturalmente. A diferencia de una opsonina, una citocina no se une naturalmente contemporáneamente a un antígeno y un receptor de la superficie celular.

Los leucocitos que llevan receptores para citocinas incluyen, por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, linfocitos, linfocitos T, linfocitos B, células NK, células de mieloma, células de linfoma y células leucémicas.

Sin desear quedar ligado por un mecanismo cualquiera, se cree que las citocinas asociadas a la superficie celular proporcionan una ventaja con respecto a las citocinas libremente difundibles, permitiendo la yuxtaposición estable de la citocina a la célula, aumentando así la concentración de citocina en la vecindad de la célula.

Citocinas preferidas son citocinas de no roedor, por ejemplo, citocinas de primate, por ejemplo, humanas.

Puede considerarse que algunas citocinas pertenecen a una o más familias de citocinas basándose en propiedades estructurales y/o funcionales. Una familia tal consiste en las interleucinas. Las interleucinas son estructuralmente diversas, pero comparten la propiedad de tanto expresarse por como de actuar sobre leucocitos. Ejemplos de interleucinas incluyen IL-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M15330, M28983, E04743, M15131), IL-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank E01108, K02797), IL-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank A02046, M14743), IL-4 (por ejemplo, polipéptidos codificados por M13982, M25892), IL-5 (por ejemplo, polipéptidos codificados por X06270, J03478), IL-6 (por ejemplo, polipéptidos codificados por E02772, M20572), IL-7 (por ejemplo, polipéptidos codificados por J04156, M29054-29057), IL-8 (por ejemplo, polipéptidos codificados por M28130), IL-9 (por ejemplo, secuencias divulgadas en Kelleher y col., Blood. 1991; 77: 1436-1441, Immunogenetics 1990;31(4):265-270), IL-10 (por ejemplo, polipéptidos codificados por M84340, U16720), IL-11 (por ejemplo, secuencias divulgadas en Paul y col., Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 7512-7516, Morris y col., Exp Hematol. 1996; 24: 1369-1376), IL-12 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M86671, S82412; proteína de Genbank P29459, P29460),

IL-13 (por ejemplo, polipéptidos codificados por U31120, L13028), IL-14 (por ejemplo, secuencias divulgadas en Ainbrus y col., Proceedings of the National Academy of Science (USA) 1993; 90: 6330-4), IL-15 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF031167, U22339), IL-16 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF006001, M90391), IL-17 (por ejemplo, polipéptidos codificados por U32659, U43088), IL-18 (por ejemplo, polipéptidos codificados por D49949, D49950), IL-19 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AY040367), IL-20 (por ejemplo, polipéptidos codificados por NM02130, NM018724), IL-21 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF254069, AF254070), IL-22 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF279437), IL-23 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF301619, AF301620, AY055379 [la cadena alfa de p19 se combina con la cadena de p40 de IL-12 para formar IL-23]), IL-24 (por ejemplo, polipéptidos codificados por AF276916, NM053095), IL-25 (por ejemplo, polipéptidos codificados por NM080837), TNF-alfa (por ejemplo, polipéptidos codificados por M16441, Y00467), y GM-CSF (por ejemplo, polipéptidos codificados por X03019, M11220) y sus homólogos entre especies. Secuencias de nucleótidos que codifican homólogos se hibridarán entre sí bajo condiciones de rigurosidad de moderada a alta.

Otra familia consiste en las hematopoyetinas. Miembros de esta familia comprenden regiones helicoidales, conocidas como hélices A, B, C y D. Las hélices A y B y las hélices C y D se mantienen bastante paralelas entre sí, respectivamente. Ejemplos de hematopoyetinas incluyen IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank E01219, M13926), oncostatina M (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D31942, secuencias divulgadas en Malik y col., Mol Cell Biol 1989, 9:2847-2853), LIF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X13967, X06381), CNTF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U05342, X60542), y sus homólogos entre especies. Secuencias de nucleótidos que codifican homólogos se hibridarán entre sí bajo condiciones de rigurosidad de moderada a alta.

La IL2 humana es una proteína de 133 aminoácidos (15,4 kDa) con un pl ligeramente básico. La IL2 murina y humana muestran una homología de aproximadamente el 65%. IL2 se sintetiza como una proteína precursora de 153 aminoácidos sirviendo los 20 primeros aminoácidos del extremo amino de secuencia señal secretora hidrófoba. La proteína contiene un único enlace disulfuro (posiciones Cys58/105) esencial para la actividad biológica.

La IL2 está O-glicosilada en la treonina en la posición 3. Variantes con diferentes masas y cargas moleculares son debidas a glicosilación variable. La IL2 no glicosilada también es biológicamente activa. Parece que la glicosilación promueve la eliminación del factor por hepatocitos.

Una forma dímera de IL2 humana, producida por la acción de una transglutaminasa aislada de nervios ópticos de pez en regeneración, se ha mostrado que es un factor citotóxico para oligodendrocitos de cerebro de rata en cultivo.

El gen IL2 humana contiene cuatro exones. El gen IL2 está mapeado en el cromosoma humano 4q26-28 (cromosoma 3 murino). La homología de IL2 murina y humana es del 72% al nivel de nucleótidos en la región codificante.

Las actividades biológicas de IL2 están mediadas por un receptor de membrana que se expresa casi exclusivamente en linfocitos T activados, pero no en reposo, a densidades de $4-12 \times 10^3$ receptores/célula. Los linfocitos B activados y los leucocitos mononucleares en reposo raramente expresan este receptor. La expresión del receptor de IL2 se modula por IL5 e IL6. Se distinguen tres tipos diferentes de receptores de IL2 que se expresan diferencialmente e independientemente. El receptor de IL2 de alta afinidad ($K_{dis} \approx 10$ pM) constituye aproximadamente el 10% de todos los receptores de IL2 expresados por una células. Este receptor es un complejo de receptor de membrana que consiste en las dos subunidades IL2R-alfa (antígeno TAC = antígeno de activación de linfocitos T; p55) y IL2R-beta (p75; CD122) como dominios de unión a ligando y una cadena gamma como componente de señalización. p75 se expresa constitutivamente en linfocitos T en reposo, células NK y varios otros tipos de células, mientras que la expresión de p55 se observa normalmente solo después de la activación celular. Sin embargo, p55 se sintetiza constitutivamente por varias células tumorales y por células infectadas por el HTLV-1.

La expresión del receptor de IL2 de monocitos se induce por IFN-gamma, de manera que estas células se vuelven citotóxicas para tumores. En linfocitos T, la expresión de p75 puede reducirse por IL3. Un receptor de IL2 de afinidad intermedia ($K_{dis} = 100$ pM) consiste en la subunidad p75 y una cadena gamma (véase más adelante), mientras que un receptor de baja afinidad ($K_{dis} = 10$ nM) se forma por p55 solo.

p55 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X01057) tiene una longitud de 251 aminoácidos con un dominio extracelular de 219 aminoácidos y un dominio citoplásmico muy corto de 13 aminoácidos. El gen p55 está mapeado en el cromosoma humano 10p14-p15.

p75 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M26062, M28052) tiene una longitud de 525 aminoácidos con un dominio extracelular de 214 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 286 aminoácidos. El gen p75 contiene 10 exones y tiene una longitud de aproximadamente 24 kb. Está mapeado en el cromosoma humano 22q11.2-q12 y en el cromosoma murino 15 (banda E).

Se ha descrito una tercera subunidad de 64 kDa del receptor de IL2, designada gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D13821, D1086). Las subunidades gamma murinas y humanas del receptor tienen aproximadamente el 70% de identidad de secuencias a los niveles de nucleótidos y aminoácidos.

Esta subunidad se requiere para la generación de receptores de IL2 de afinidad alta e intermedia, pero no se une a IL2 por sí mismo. Estos dos tipos de receptores consisten en un heterotrímero alfa-beta-gamma y un heterodímero beta-gamma, respectivamente. El gen que codifica la subunidad gamma del receptor de IL2 está mapeado en el cromosoma humano Xq13, abarca aproximadamente 4,2 kb y contiene ocho exones. Se ha mostrado recientemente que la subunidad gamma del receptor de IL2 es un componente de los receptores para IL4 e IL7. También se cree que es un componente del receptor de IL13.

Los aminoácidos en las posiciones 267-317 que se encuentran directamente adyacentes a la región transmembrana de p75 participan en la transducción de señales mediada por IL2. Además, el receptor de IL2 está asociado a varias otras proteínas (p22, p40, p100) que se cree que participan en la mediación de cambios conformacionales en las cadenas del receptor, endocitosis mediada por receptor y otros procesos de transducción de señales. Una de las proteínas identificadas es la molécula de adhesión a células de 95 kDa ICAM-1 que probablemente concentra receptores de IL2 en regiones de contactos célula a célula y así puede mediar en actividades paracrina, por ejemplo, durante la estimulación mediada por IL2 de linfocitos T. Otra proteína asociada a p75 es una proteína cinasa específica de tirosina llamada Ick. La observación de que la proliferación de células inducidas por IL2 se inhibe por inhibidores específicos de proteína tirosina cinasas en una línea celular negativa para Ick sugiere que otras cinasas también pueden asociarse a receptores de IL2. Se han identificado dos de tales cinasas, llamadas fyn y lyn. Además, la señalización del receptor de IL2 también puede estar mediada por vav.

Los linfocitos activados continuamente secretan un fragmento de 42 kDa del antígeno TAC. Este fragmento circula en el suero y plasma y funciona de receptor de IL2 soluble (sIL2R). Las concentraciones de este receptor soluble varían sustancialmente en diferentes situaciones patológicas, por ejemplo, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, leucemias, o después de trasplante de órganos. Los niveles pueden aumentar hasta 100 veces. Los niveles de sIL2R parecen correlacionarse con la gravedad de enfermedades inducidas por el VIH y puede ser de valor diagnóstico también en otros entornos.

IL2 de ratón y humano producen ambos proliferación de linfocitos T de las especies homólogas a alta eficiencia. IL2 humana también estimula la proliferación de linfocitos T de ratón a concentraciones similares, mientras que IL2 de ratón estimula linfocitos T humanos a una menor eficiencia (seis veces a 170 veces).

IL2 es un factor de crecimiento para todas las subpoblaciones de linfocitos T. Es un factor de proliferación no específico para antígeno para linfocitos T que induce progresión del ciclo celular en células en reposo y así permite la expansión clónica de linfocitos T activados. Este efecto se modula por hormonas tales como prolactina.

IL2 también promueve la proliferación de linfocitos B activados, también esto requiere la presencia de factores adicionales, por ejemplo, IL4.

Debido a sus efectos sobre linfocitos T y linfocitos B, IL2 es un regulador central de respuestas inmunitarias. También desempeña una función en reacciones antiinflamatorias, en hematopoyesis y en la supervisión de tumores. IL2 estimula la síntesis de IFN-gamma en leucocitos periféricos y también induce la secreción de IL1, TNF-alfa y TNF-beta.

Se cree que la inducción de la secreción de citocinas tumorocidas, aparte de la actividad en la expansión de células LAK (células asesinas activadas por linfocina), son probablemente los principales factores responsables de la actividad antitumoral de IL2.

IL2 puede ensayarse en bioensayos empleando líneas celulares que responden al factor (por ejemplo, ATH8, CT6, CTLL-2, FDCPmix, HT-2, NKC3, TALL-103). También están disponibles ensayos de ELISA específicos para IL2 e inmunoensayos enzimáticos para el receptor soluble. El receptor soluble también puede detectarse empleando IL2 biotinilada y citometría de flujo o ensayos de ELISA.

IL2 muestra actividad antitumoral significativa para una variedad de tipos de células tumorales, ya que soporta la proliferación y expansión clónica de linfocitos T que atacan específicamente ciertos tumores. IL2 se usa cada vez más para tratar pacientes con cánceres resistentes al tratamiento convencional. La terapia de combinación con IL2 sistémicamente administrada ha producido remisiones a largo plazo en el 30% de los pacientes con carcinoma metastásico de células renales, para el que no hay tratamiento convencional. También se han documentado las respuestas clínicas objetivas y longevas en una proporción de pacientes con melanoma o leucemia mieloide aguda.

La terapia con IL2 sistémica a alta dosis también está asociada a un gran número de efectos secundarios tóxicos no deseados. La IL2 tiene efectos adicionales sobre otros componentes del sistema inmunitario celular, que incluyen linfocitos B y macrófagos, e induce la secreción de otros mediadores solubles, que incluyen TNF-alfa, TNF-beta e IFN-gamma. Estos efectos pueden contribuir a la actividad antitumoral de IL2, además de a su toxicidad relacionada con la dosis.

Se ha mostrado que la transducción de células tumorales murinas con un gen IL2 funcional conduce al rechazo de las células genéticamente modificadas por huéspedes singéneos. Células tumorales alteradas que expresan IL2 también aumentan la inmunidad sistémica.

- 5 IL4 humana es una proteína de 129 aminoácidos (20 kDa) que se sintetiza como un precursor que contiene una secuencia señal secretora hidrófoba de 24 aminoácidos. IL4 está glicosilada en dos residuos de arginina (posiciones 38 y 105) y contiene seis residuos de cisteína que participan en la formación del enlace disulfuro. Los enlaces disulfuro son esenciales para la actividad biológica. Se han descrito algunas variantes de glicosilación de IL4 que se diferencian en sus actividades biológicas. Una comparación de IL4 murina y humana muestra que ambas proteínas solo divergen en las posiciones 91-128.
- 10 Una variante de IL4, Y124D, en la que Tyr124 de la proteína humana recombinante está sustituida con un residuo de ácido aspártico, se une con alta afinidad al receptor de IL4 (Kd =310 pM). Esta variante es un poderoso antagonista para el sistema de receptor de IL4. No retiene actividad proliferativa detectable para linfocitos T e inhibe competitivamente la proliferación de linfocitos T dependiente de IL4 (K(i) = 620 pM). La existencia de este mutante demuestra que la unión de alta afinidad y la generación de señales pueden desacoplarse eficazmente en un ligando. Y124D también actúa de poderoso antagonista para el receptor de IL13.
- 15 El gen IL4 humana contiene cuatro exones y tiene una longitud de aproximadamente 10 kb. Está mapeado en el cromosoma 5q23-31. El gen murino está mapeado en el cromosoma 11. El gen IL4 está en estrecha proximidad a otros genes que codifican factores de crecimiento hematopoyéticos (por ejemplo, GM-CSF, M-CSF, IL3, IL5). La distancia entre el gen IL4 y IL5 es aproximadamente 90-240 kb.
- 20 Al nivel de nucleótidos, el gen IL4 humano y murino muestra aproximadamente el 70% de homología. La región 5' de IL4 contiene varios elementos de secuencia, designados CLE (elemento de linfocina conservado), que son sitios de unión para factores de transcripción que controlan la expresión de este y otros genes. Un motivo de secuencia, llamada la secuencia P (CGAAAATTTCC; SEC ID N°: 1) en la región 5' del gen IL4 humano (posiciones -79 - - 69), es el sitio de unión para un factor nuclear, llamado NF(P), que media en la respuesta a señales de activación de linfocitos T.
- 25 Las actividades biológicas de IL4 están mediadas por un receptor específico (Kdis =20-100 pM) que se expresa a densidades de 100-5000 copias/célula (por ejemplo, polipéptidos codificados por el n° de acceso de GenBank M29854, X52425). El dominio extracelular del receptor de IL4 está relacionado con los receptores para eritropoyetina (Epo), IL6, y la cadena beta del receptor de IL2. Se le ha dado el nombre CD124.
- 30 El ADNc para el receptor de IL4 murino codifica una proteína transmembrana de 810 aminoácidos (incluyendo una secuencia señal secretora). Este receptor tiene un gran dominio intracelular de 553 aminoácidos. El receptor humano tiene un dominio extracelular de 207 aminoácidos, un dominio transmembrana de 24 residuos y un gran dominio intracelular de 569 aminoácidos.
- 35 Se ha mostrado recientemente que el receptor de IL4 contiene la subunidad gamma del receptor de IL2 como componente de señalización. Esta subunidad gamma también está asociada a los receptores para IL4 y IL7 y probablemente también de IL13. Se han descrito dos formas del receptor, una de las cuales es secretada. El receptor secretado solo contiene el dominio de unión a IL4 extracelular y puede bloquear actividades de IL4. Se ha mostrado que una proteína de unión a IL4 (IL4-BP) que se une a IL4 con la misma afinidad que el receptor de IL4 también es una variante de receptor de IL4 soluble. Estos receptores solubles probablemente sirven de reguladores fisiológicos de las actividades de citocinas, inhibiendo la unión del receptor o actuando de proteínas de transporte. También se han descrito receptores solubles o proteínas de unión para IL1 (antagonista de receptor de IL1), IL2, IL6, IL7, TNF-alfa, IGF e IFN-gamma.
- 40 Las actividades biológicas de IL4 son específicas para especie; IL4 de ratón es inactiva en células humanas e IL4 humana es inactiva en células murinas. IL4 promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados, la expresión de antígenos del MHC de clase II y de receptores de IgE de baja afinidad en linfocitos B en reposo. IL4 potencia la expresión de antígenos del MHC de clase II sobre linfocitos B. Puede promover su capacidad para responder a otros estímulos de linfocitos B y para presentar antígenos para linfocitos T. Esto puede ser una forma para promover la expansión clónica de linfocitos B específicos y el sistema inmunitario puede así responder a concentraciones muy bajas de antígenos. La producción de IL4 por linfocitos no B no T se estimula si estas células interactúan con otras células mediante sus receptores de Fc para IgE o IgG. Este efecto puede ser potenciado por IL3. IL2 y PAF (factor activador de plaquetas) inducen la síntesis de IL4 mientras que TGF-beta la inhibe.
- 45 IL3 antagoniza los efectos inducidos por IL2 en linfocitos B y produce una lenta disminución de la expresión de receptores de IL2, inhibiendo así la proliferación de linfocitos B humanos estimulados por IL2. En linfocitos B activados, IL4 estimula la síntesis de IgG1 e IgE e inhibe la síntesis de IgM, IgG3, IgG2a e IgG2b. Este cambio de isotipo inducido por IL4 en linfocitos B se antagoniza por IFN-gamma. El crecimiento de mielomas múltiples puede suprimirse por IL4, que inhibe la síntesis de IL6, un factor de crecimiento de mieloma. IL4 también inhibe la síntesis de IL6 en macrófagos alveolares humanos.
- 50 El pretratamiento de macrófagos con IL4 previene la producción de IL1, TNF-alfa y prostaglandinas en respuesta a la activación de las células por endotoxinas bacterianas o IFN-gamma.
- 55 IL4 sinergiza con Epo y G-CSF/Epo en la generación de colonias que contienen granulocitos o células progenitoras eritroides en un ensayo de formación de colonias.

El procedimiento de detección clásico para IL4 es un ensayo de coestimulación de linfocitos B que mide la proliferación potenciada de linfocitos B purificados estimulados. IL4 puede detectarse también en bioensayos, empleando células sensibles a IL4 (por ejemplo, BALM-4; BCL1; CT.4S; CTL44; CTLL-2; Da; FDCPmix; HT-2; L4; L138.8A; MOPE; MC/9; NFS-60; Ramos, Sez627, TF-1; TS1). Un procedimiento de detección específico para IL4 humana es la inducción de CD23 en varias líneas de linfocitos B con CD23 detectado tanto por citometría de flujo como por un inmunoensayo de fluorescencia. Un inmunoensayo que permite la rápida determinación de la tasa de producción de IL4 en condiciones que previenen el consumo/degradación es inmunoatrapamiento de citocinas.

IL4 inhibe el crecimiento de carcinomas de colon y mamario. Se ha mostrado que aumenta el desarrollo de células LAK. La transducción de células murinas tumorales con un gen IL4 funcional se ha mostrado que conduce al rechazo de las células genéticamente modificadas por huéspedes singéneos. Células tumorales alteradas que expresan IL4 también aumentan la inmunidad sistémica. Ratones vacunados con células transducidas rechazan una exposición posterior de células no transducidas, y, en algunos casos, un tumor preexistente.

IL6 humana es una proteína de 185 aminoácidos glicosilada en las posiciones 73 y 172. Se sintetiza como una proteína precursora de 212 aminoácidos. Los monocitos expresan al menos cinco formas moleculares diferentes de IL6 con masas moleculares de 21,5-28 kDa. Principalmente se diferencian por alteraciones postraduccionales tales como glicosilación y fosforilación.

IL6 aislada de diversos tipos de células muestra alguna microheterogeneidad en su extremo N. Se ha observado una forma de 42-45 kDa en plasma que está probablemente complejada con una proteína portadora, alfa-2-macroglobulina ($\alpha 2M$). IL6 murina y humana muestran el 65% de homología de secuencias al nivel de ADN y el 42% de homología al nivel de proteínas.

IL6 es un miembro de una familia de citocinas que también incluye LIF, CNTF, oncostatina M, IL11 y CT-1. Todos los miembros conocidos de la familia de citocinas IL6 inducen expresión hepática de proteínas de fase aguda.

Una citocina de diseño estable y altamente bioactiva que consiste en una proteína de fusión entre IL6 y un receptor de IL6 soluble, designado H-IL6, se ha usado para la expansión de células progenitoras hematopoyéticas humanas y es útil en casos en los que las células no responden a IL6, sino que requieren un complejo estable que consiste en IL6 y un receptor de IL6 soluble.

El gen IL6 humano tiene una longitud de aproximadamente 5 kb y contiene cinco exones. Está mapeado en el cromosoma humano 7p21-p14 entre los marcadores D7S135 y D7S370. El gen murino está mapeado en el cromosoma 5. Las secuencias de nucleótidos de los genes IL6 y G-CSF se parecen entre sí de forma que sugieren una posible relación evolutiva.

El receptor de IL6 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M20566, E03515) se expresa en linfocitos T, linfocitos B activados por mitógeno, monocitos periféricos y algunos tipos de células tumorales derivadas de macrófagos y linfocitos B. No se expresa en linfocitos B en reposo, pero está en linfocitos T en reposo. En hepatocitos, la expresión del receptor de IL6 se potencia después del tratamiento con IL6 o IL1. En varios tipos de células, la expresión del receptor de IL6 también se potencia por glucocorticoides. El gen del receptor de IL6 está mapeado en el cromosoma humano 1q21.

El receptor de IL6 es una proteína fuertemente glicosilada de 80 kDa y una longitud de 449 aminoácidos. Se ha designado CD126. Se sintetiza como un precursor de 468 aminoácidos. La estructura molecular se parece a la de receptores para M-CSF, PDGF e IL1 en los que el receptor contiene un dominio de secuencia similar a inmunoglobulina en la región del extremo amino del dominio del receptor extracelular.

El dominio intracelular del receptor de IL6 tiene una longitud de aproximadamente 82 aminoácidos y no muestra ninguna homología con otras proteínas que participan en la transducción de señales intracelulares. Se han descrito dos formas diferentes del receptor que se unen a IL6 con diferentes afinidades ($K_{dis} = 10^{-9}$ y 10^{-11} M) y lo más probablemente se produce por modificación postraduccionales de la misma proteína receptora. También se han encontrado actividades biológicas de IL6 a concentraciones de 10^{-13} a 10^{-15} M, sugiriendo tanto la existencia de otras conformaciones de receptor de alta afinidad como la existencia de moléculas receptoras adicionales con mayores afinidades:

La transducción de señales mediada por receptores de IL6 implica proteína cinasa C y también adenilato ciclasa.

El complejo formado entre IL6 y su receptor se asocia con una glicoproteína transmembrana, gp130 (918 aminoácidos; dominio citoplásmico de 277 aminoácidos), que participa en la transducción de señales. La unión de IL6 a su receptor conduce a homodimerización ligada a disulfuro de gp130 y la activación asociada de una tirosina cinasa como primera etapa de transducción de señales. gp130 se expresa también en células que no expresan receptores de IL6. Se ha encontrado que es un componente de otros receptores, que incluyen aquellos para IL11, LIF, oncostatina M, y CNTF y CT-1. Esto explica por qué LIF, CNTF e IL6 comparten muchas actividades biológicas, aunque los propios factores no estén relacionados entre sí. Se ha encontrado que un factor que se parece a proteínas STAT, llamado factor LIL, participa en rutas de señalización de IL6, y también de IL1 y lipopolisacáridos bacterianos.

También se ha descrito una forma soluble del receptor de IL6 (IL6R-SUP (proteína urinaria soluble del receptor de IL6)) de manera que también interacciona con gap130. Estos receptores solubles probablemente sirven de reguladores fisiológicos de actividades de citocina inhibiendo la unión a receptor o actuando de proteínas de transporte. También se han descrito receptores solubles similares o proteínas de unión para IL1 (IL1 ra, antagonista de receptores de IL1), IL2, IL4, IL7, TNF-alfa, IGF e IFN-gamma.

Algunas células, que incluyen células progenitoras hematopoyéticas y células neuronales, solo son sensibles a una combinación de IL6 y receptor de IL6 soluble, pero no a IL6 sola.

La IL6 humana es biológicamente activa en monos, ratas y ratones. La IL6 murina no es activa en células humanas. La pléthora de actividades biológicas se ejemplifica por los muchos diferentes acrónimos bajo los que se ha descrito IL6. IL6 es una citocina pleiotrópica que influye en respuestas inmunitarias específicas de antígeno y reacciones inflamatorias. Es uno de los principales mediadores fisiológicos de la reacción de fase aguda. En hepatocitos, IL6 en combinación con glucocorticoides induce la síntesis de metalotioneínas y aumenta los niveles de cinc intracelular, previniendo así la hepatotoxicidad inducida por hepatotoxicidad inducida por CCL4. IL6 es un factor neurotrófico para neuronas colinérgicas que promueve su supervivencia en cultivo. Algunas líneas celulares neuronales pueden inducirse para diferenciarse por IL6.

IL6, al igual que IL1, estimula la síntesis de ACTH (corticotropina) en la pituitaria. Los glucocorticoides sintetizados en respuesta a ACTH inhiben la producción de IL6, IL1 y TNF *in vivo*, estableciendo así un tipo de bucle de retroalimentación negativa entre el sistema inmunitario y funciones neuroendocrinas. En astrocitos, IL6 induce la síntesis de factor de crecimiento nervioso (NGF).

IL6 es un factor de diferenciación de linfocitos B *in vivo* y *in vitro* y un factor de activación para linfocitos T. En presencia de IL2, IL6 induce la diferenciación de linfocitos T maduros e inmaduros en linfocitos T citotóxicos. IL6 también induce la proliferación de timocitos y probablemente desempeña una función en el desarrollo de linfocitos T tímicos.

IL6 puede inducir la maduración final de linfocitos B en células plasmáticas que secretan inmunoglobulina si las células se han preactivado por IL4. En linfocitos B, IL6 estimula la secreción de anticuerpos a un grado tal que los niveles de IgG1 en suero puedan aumentar 120-400 veces.

IL6 a concentraciones de solo 0,002 ng/ml es uno de los principales moduladores del crecimiento autocrino para muchos mielomas humanos. El crecimiento de estas células puede inhibirse por anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL6. Puede inhibirse también por la introducción de oligonucleótidos antisentido contra IL6 o por IL4. Los efectos inhibidores del crecimiento de corticosteroides sobre células de mieloma son probablemente debidos a la reducción inducida por esteroides en la expresión de IL6. El crecimiento de células de mieloma dependientes de IL6 humana también puede inhibirse por IFN-gamma. IL6 también puede servir de modulador del crecimiento autocrino para otros tipos de tumores, algunos de los cuales se ha encontrado que secretan IL6 constitutivamente. Se ha mostrado que IL6 es un modulador autocrino del crecimiento para crecimiento celular de tumor cervical *in vitro*. Por otra parte, IL6 bloquea el crecimiento de algunos tumores sólidos tales como carcinomas mamarios, carcinomas cervicales, líneas celulares de cáncer de pulmón humano, linfomas histiocíticos y melanomas.

IL6 y IL3 sinergizan *in vitro* en la promoción de la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas multipotentes. IL6 también es una trombopoyetina que induce la maduración de megacariocitos *in vitro* y aumenta el número de plaquetas *in vivo*. En cultivos de médula ósea murina, pero no en humana, IL6 muestra actividades que se parecen a las de GM-CSF.

Las células de plasmacitoma producen IL6 y también el receptor de IL6. Se ha sugerido que estas células se estimulan en un modo autocrino. También se ha descrito un mecanismo paracrino que implica la presencia de dos poblaciones de células diferentes, una que produce el factor y la otra que expresa el receptor.

IL6 puede detectarse en bioensayos empleando líneas celulares sensibles a IL6 (por ejemplo, 7TD1; B9; CESS, KPMM2, KT-3; M1, MH60-BSF-2, M07E; Mono Mac 6; NFS-60; PIL-6; SKW6-C14; T1165; XG-1). IL6 puede ensayarse también por su actividad como factor de crecimiento de hibridoma. También están disponibles inmunoensayos sensibles y pruebas colorimétricas. Existe un ensayo de ELISA para detectar proteína gp 130 asociada al receptor.

En combinación con otras citocinas (por ejemplo, IL2), IL6 puede ser útil en el tratamiento de algunos tipos de tumores. Se ha mostrado que la transducción de células murinas tumorales con un gen IL6 funcional conduce al rechazo de las células genéticamente modificadas por huéspedes singeneicos. Células tumorales alteradas que expresan IL6 también aumentan la inmunidad sistémica. Ratones vacunados con células transducidas rechazan una exposición posterior de células no transducidas, y, en algunos casos, un tumor preexistente.

IL10 humana es una proteína homodímera con subunidades que tienen una longitud de 160 aminoácidos. IL10 humana muestra el 73% de homología de aminoácidos con IL10 murina. La IL10 humana contiene cuatro exones. Está estrechamente relacionada con el producto del gen BCRF-1 (fragmento Barn HI C a la derecha de la pauta de lectura) del virus de Epstein-Barr (84% de homología al nivel de proteínas). Estas dos proteínas están más

estrechamente relacionadas entre sí que IL10 humana y murina. Por tanto, BCRF-1 también se ha llamado IL10 viral (vIL10). El gen IL10 humana está mapeado en el cromosoma 1. La IL10 humana muestra el 81% de homología con IL10 murina al nivel de nucleótidos.

5 Se ha identificado un receptor sobre células murinas y humanas usando IL10 radiomarcada (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L12120, U00672). IL10 de ratón puede bloquear la unión de IL10 humana a células de ratón, pero no humanas. El receptor de IL10 murina se ha clonado. Este receptor es una proteína de aproximadamente 110 kDa que se une a IL10 murina específicamente. Este receptor se relaciona estructuralmente con receptores para IFN.

10 IL10 inhibe la síntesis de varias citocinas tales como IFN-gamma, IL2 y TNF-beta en subpoblaciones Th1 de linfocitos T, pero no de células Th2. Esta actividad es antagonizada por IL4. El efecto inhibitorio sobre la producción de IFN-gamma es indirecto y parece ser el resultado de una supresión de la síntesis de IL12 por células accesorias. En el sistema humano, IL10 se produce por, y regula por disminución la función de, células Th1 y Th2. En macrófagos estimulados por lipopolisacáridos bacterianos, IL10 inhibe la síntesis de IL1, IL6 y TNF-alfa promoviendo, entre otras cosas, la degradación de ARNm de citocina. También conduce a una inhibición de
15 presentación de antígeno. En monocitos humanos, IFN-gamma y IL10 antagonizan la producción y función del otro. Se ha mostrado que IL10 también es un antagonista fisiológico de IL12.

20 IL10 también inhibe la proliferación inducida por mitógeno o por anti-CD3 de linfocitos T en presencia de células accesorias y reduce la producción de IFN-gamma e IL2. IL2 e IL4 exógenas inhiben el efecto inhibitorio de la proliferación, pero no influyen en la producción de IFN-gamma. En macrófagos estimulados por LPS, IFN-gamma aumenta la síntesis de IL6 inhibiendo la producción de IL10. IL10 parece ser responsable de la mayoría o de toda la capacidad de sobrenadantes de Th2 para inhibir la síntesis de citocinas por células Th1.

IL10 inhibe la secreción de Ig por antígenos independientes de linfocitos T inducida por IL5, pero no la inducida por IL2.

25 Linfocitos Ly-1 B murinos son la principal fuente de IL10. A diferencia de otros linfocitos B, los linfocitos Ly-1 B expresan niveles constitutivos e inducibles enormemente elevados de IL10. Estas células también tienen la propiedad distintiva de auto-reposición continua. El tratamiento continuo de ratones recién nacidos con anticuerpos anti-IL10 conduce a un agotamiento de los linfocitos Ly-1 B, mientras que se mantiene una población normal de linfocitos B esplénicos. Estos ratones también contienen niveles de inmunoglobulina M en suero enormemente reducida y también están alterados en sus respuestas de anticuerpos a antígenos específicos. Por tanto, la IL10 es
30 un regulador del desarrollo de linfocitos Ly-1 B. El mecanismo de utilización de linfocitos Ly-1 B parece implicar la elevada producción de IFN-gamma, ya que la co-administración de anticuerpos anti-IFN-gamma neutralizantes restaura sustancialmente el número de linfocitos Ly-1 B resistentes peritoneales.

35 IL10 también es un coestimulante para el crecimiento de timocitos maduros e inmaduros (junto con IL2, IL4 e IL7) y sirve de factor de diferenciación de linfocitos T citotóxicos, promoviendo que proliferen un mayor número de precursores de linfocitos T citotóxicos activados por IL2 y se diferencien en células efectoras citotóxicas. IL10 sostiene la viabilidad de linfocitos B *in vitro* y también estimula linfocitos B y promueve su diferenciación. Potencia la expresión de antígenos de la clase II del MHC en linfocitos B mientras que inhibe la expresión de la clase II del MHC sobre monocitos. En linfocitos B activados mediante sus receptores de antígeno o mediante CD40, IL10 induce la secreción de IgG, IgA e IgM. Este efecto es sinergizado por IL4, mientras que la síntesis de inmunoglobulinas
40 inducida por IL10 es antagonizada por TGF-beta. La activación de macrófagos puede prevenirse por IL10.

45 Se ha mostrado que IL10 humana es un quimioatrayente potente y específico para linfocitos T humanos. La actividad quimiotáctica está dirigida hacia células que expresan CD8 y no hacia células CD4 (+). IL10 también inhibe la respuesta quimiotáctica de células CD4 (+), pero no de células CD8 (+), hacia IL8. IL10 puede detectarse con un ensayo de ELISA sensible. La línea de mastocitos murinos D36 puede usarse para bioensayar IL10 humana. El factor intracelular puede detectarse también por citometría de flujo.

50 La introducción de un vector de expresión de IL10 en células CHO se ha usado para analizar las consecuencias de la producción de IL10 local *in vivo*. Estas células alteradas ya no fueron tumorigénicas en ratones sin pelo o ratones SCID inmunodeficientes combinados graves y también suprimieron el crecimiento de números iguales de células CHO normales co-inyectadas. Mientras que los tumores de CHO normales se infiltran normalmente sustancialmente por macrófagos, estos estuvieron prácticamente ausentes dentro de tejidos tumorales de CHO-IL10, sugiriendo que IL10 suprime indirectamente el crecimiento tumoral de ciertos tumores inhibiendo la infiltración de macrófagos que puede proporcionar actividad promotora del crecimiento tumoral.

55 IL12 humana es una glicoproteína de 70 kDa heterodímera que consiste en una subunidad de 40 kDa (p40, 306 aminoácidos; 10% de hidrato de carbono) y una subunidad de 35 kDa (p35, 197 aminoácidos; 20% de hidrato de carbono) ligadas por enlaces disulfuro que son esenciales para la actividad biológica de IL12. p40 contiene 10 cisteínas y un sitio de unión para heparina; p35 contiene 7 cisteínas.

Las dos subunidades de IL12 no están relacionadas con ninguna otra proteína conocida. p40 muestra alguna homología con el dominio extracelular del receptor para IL6, y p35 parece ser un homólogo de IL6.

Se han descrito proteínas de fusión de IL12 murina e humana bioactivas que combinan las dos subunidades de IL12 en una única molécula. Esta citocina de diseño retiene actividad antitumoral *in vivo*. También se ha descrito Flexi 12, una proteína monocatenaria que retiene todas las características biológicas de la IL12 recombinante dímera.

5 El gen que codifica la subunidad p40 de IL12 (IL12B) está mapeado en el cromosoma humano 5q31-q33 en la misma región que también aloja los otros genes de citocina. El gen que codifica la subunidad p35 de IL12 (IL12A) está mapeado en el cromosoma humano 3p12-q13.2. La expresión de los dos genes está regulada independientemente entre sí.

10 El receptor de IL12 parece ser una proteína única de aproximadamente 110 kDa (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U03187, U23922, U64198, U64199). Hasta 1000-9000 receptores de IL12 de alta afinidad/célula se expresan en células mononucleares de sangre periférica activadas por diversos mitógenos de linfocitos T o por IL2. Los receptores de IL12 están presentes en linfocitos T activados que expresan CD4 y CD8 y en linfocitos citolíticos espontáneos positivos para CD56 activados. Las células mononucleares de sangre periférica en reposo, linfocitos B amigdalinos, o linfocitos B amigdalinos activados por anti-IgM/Dx, anti-IgM/Dx +IL2, o SAC +IL2 no expresan el receptor. Los receptores de IL12 de alta afinidad se expresan
15 constitutivamente en una línea celular similar a NK de tíft transformada, HVS.SILVA 40.

La unión de IL12 a su receptor puede prevenirse por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la subunidad p40 que, por tanto, contiene el sitio de unión. La subunidad p40 de IL12 muestra homología con el dominio extracelular del receptor de IL6. Un homólogo codificado por virus de la subunidad p40 es el gen 3 inducido por EBV.

20 IL12 humana no es activa en linfocitos murinos. Heterodímeros híbridos que consisten en subunidades p35 murina y p40 humana retienen bioactividad en células murinas; sin embargo, la combinación de p35 humana y p40 murina es completamente inactiva en células murinas. IL12 murina es activa en tanto linfocitos murinos como humanos. Se ha mostrado que la subunidad p40 de la subunidad p40 de IL12 murina (IL12p40) antagoniza específicamente los efectos del heterodímero de IL12 en diferentes sistemas de ensayo y sirve de inhibidor específico endógeno para el heterodímero de IL12.

25 IL12 estimula la proliferación de linfoblastos humanos activados por fitohemaglutinina. IL12 activa células NK positivas para CD56, y esta actividad se bloquea por anticuerpos específicos para TNF-alfa. IL12 promueve reacciones de CTL alogénicos específicos. IL12 sinergiza también con anticuerpos anti-CD3 y con estimulación alogénea en cultivos de linfocitos mixtos en inducir proliferación de linfocitos T.

30 En linfocitos periféricos del tipo Th1, IL12 induce la síntesis de IFN-gamma e IL2, y TNF. TNF-alfa también parece participar en la mediación de los efectos de IL12 sobre linfocitos citolíticos espontáneos ya que los efectos de IL12 se inhiben por un anticuerpo dirigido contra TNF-alfa. IL12 y TNF-alfa son coestimulantes para la producción de IFN-gamma maximizando IL12 la respuesta de IFN-gamma; la producción de IL12, TNF e IFN-gamma se inhibe por IL10. En células auxiliares Th2, IL12 reduce la síntesis de IL4, IL5 e IL10.

35 IL12 sinergiza con cantidades subóptimas de IL2 en promover la proliferación de células mononucleares en la sangre periférica y en promover la generación de células LAK (células asesinas activadas por linfocinas). Concentraciones picomolares de IL12 son tan eficaces como concentraciones nanomolares de IL2 en aumentar la actividad citolítica de linfocitos citolíticos espontáneos expandidos *in vivo* por IL2. IL12 también actúa de co-mitógeno y potencia la proliferación de células periféricas en reposo inducidas por IL2.

40 IL12 potencia la mielopoyesis de células progenitoras de la médula ósea primitivas inducidas por SCF (factor de citoblastos) y sinergiza con factores estimulantes de colonias para inducir la proliferación. IL12 también tiene efectos sinérgicos en progenitores de la médula ósea más comprometidos, sinergizando con IL3, IL11, o IL3 más SCF.

45 IL12 es de posible interés clínico ya que permite la reducción de dosis de IL2 requerida para la generación de células LAK (células asesinas activadas por linfocinas). Se ha mostrado que IL12 inhibe el crecimiento de una variedad de tumores experimentales *in vivo* y tiene efectos antiangiogénicos *in vivo*, que están, al menos en parte, mediados por IFN-gamma. Por tanto, parece que IL12 también es un posible candidato para el tratamiento de tumores malignos dependientes de angiogénesis.

50 IL19 e IL10 comparten el 21 por ciento de identidad de aminoácidos y son probablemente homólogos. En monocitos, el tratamiento con lipopolisacáridos bacterianos induce la síntesis de IL19 y este efecto se potencia en presencia de IL4 o IL13, pero no se afecta por IFN-gamma. GM-CSF induce directamente la expresión génica de IL19 en monocitos. Se ha mostrado que IL19 se une al complejo de receptor de IL20 (Dumoutier L y col., Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 y mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. Journal of Immunology 167(7): 3545-9 (2001); Gallagher G y col., Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). Genes Immun 1(7): 442-50 (2000)).

55 IL20 está estructuralmente relacionada con IL10. IL20 parece ser un factor autocrino para queratinocitos que regula su participación en inflamación. La expresión en exceso de IL20 en ratones transgénicos produce letalidad neonatal con anomalías de la piel caracterizadas por una alteración de la diferenciación epidérmica (Blumberg H y col., Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. Cell 104(1): 9-19 (2001); Dumoutier L

y col., Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 y mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. Journal of Immunology 167(7): 3545-9 (2001); Rich BE y Kupper TS Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. Current Biology 11(13): R531-4 (2001)).

5 Se ha identificado un receptor de IL20 que consiste en dos subunidades de receptor de citocina de clase 2 huérfanos. El receptor se expresa en piel y su expresión está espectacularmente regulada por incremento en piel psoriásica. El ajuste del receptor en una línea celular de queratinocitos implica la señalización por un miembro de las proteínas STAT, STAT3.

Se ha mostrado que el complejo de receptor de IL20 también se une a IL19 e IL24.

10 IL21 se ha aislado por Parrish-Novak y col., de una biblioteca de ADNc derivada de linfocitos T CD3 (+) activados en una búsqueda del ligando de un receptor de citocina de tipo 1 previamente aislado. El ADNc codifica una proteína secretada de 131 aminoácidos, proteína muy estrechamente relacionada con IL2 e IL15. El gen IL21 está mapeado en el cromosoma humano 4q26-q27 próximo al gen IL2. El ARNm de IL21 se expresa en CD4 (+), pero no en linfocitos T CD8 (+) después de la activación celular. Tampoco se expresa en linfocitos B y monocitos (Asao H y col., Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. Journal of Immunology 167(1):1-5 (2001); Ozaki K y col., Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. Proceedings of the National Academy of Science (USA) 97: 11439-11444 (2000); Parrish-Novak J y col., Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature 408: 57-63 (2000)).

20 La IL21 estimula la proliferación de linfocito B estimulado por reticulación del antígeno CD40. Inhibe la proliferación estimulada por IL4 más anti-IgM. IL21 aumenta la estimulación de la proliferación de linfocitos T sin tratamiento previo (CD45RA (+)), pero no de memoria (CD45RO (+)), mediada por el ajuste de CD3. IL21 estimula la proliferación de células progenitoras de la médula ósea y la expresión del marcador de células NK CD56 en presencia de IL15.

25 El receptor de IL21 ha sido aislado por Parrish-Novak y col., y se encontró que se expresaba por linfocitos B CD23 (+), líneas de linfocitos B, una línea de leucemia de linfocitos T y líneas de células NK. El gen receptor se ha mapeado en el cromosoma humano 16p12. El mismo receptor ha sido aislado por Ozaki y col., que lo llamó NILR (receptor de interleucina novedoso). El receptor (538 aminoácidos) está más estrechamente relacionado con el receptor beta de IL2 humana. El receptor contiene un motivo WSXWS (SEC ID N°: 3) en la región extracelular, típico de receptores de citocina de tipo-1. El receptor se expresa en células NK, linfocitos T y líneas de linfocitos B.

30 Se ha mostrado que la cadena gamma común, que es una subunidad indispensable de los complejos de receptores funcionales para IL2, IL4, IL7, IL9 e IL15, también es parte del complejo de receptor de IL21. El complejo de señalización funcional activa las cinasas de Janus JAK1, JAK3 y las proteínas STAT STAT1 y STAT3 (Asao y col.).

35 IL22 (180 aminoácidos que incluyen una secuencia señal; 25 kDa; también llamada IL-TIF) se identificó por un procedimiento de sustracción de ADNc como gen inducido específicamente por IL9 en linfocitos T de ratón. La proteína muestra homología limitada con IL10 (22 por ciento de identidad de aminoácidos). Las proteínas IL-TIF humanas y murinas comparten el 79 por ciento de identidad de aminoácidos.

40 Los genes IL-TIF murina y humana consisten ambos en 6 exones. El gen de una única copia humano está mapeado en el cromosoma 12q15 (90 kb del gen IFN-gamma, y 27 kb del gen AK155 que codifica otra citocina relacionada con IL10). En ratones, el gen se localiza también en la misma región que el gen IFN-gamma. En ratones BALB/c y DBA/2, el gen es un gen de una única copia. En ratones C57B1/6, FVB y 129, el gen está duplicado. Las dos copias, llamadas IL-TIF-alfa e IL-TIF-beta, muestran el 98 por ciento de identidad de nucleótidos en la región codificante y se diferencian por una delección de 658 nucleótidos en IL-TIF-beta. Este gen puede ser inactivo.

45 La expresión de IL-TIF se induce por IL9 en linfomas tímicos, linfocitos T y mastocitos, y por lectinas en esplenocitos recientemente aislados. La expresión de IL-TIF en linfocitos T no requiere la síntesis de proteínas, y depende de la activación de cinasas de Janus y proteínas STAT. IL-TIF se expresa constitutivamente en timo y cerebro.

50 En células de hepatoma humano HepG2, IL-TIF regula por incremento la producción de proteínas de fase aguda. IL-TIF también actúa de citocina pro-inflamatoria *in vivo* debido a que la inyección de la proteína también induce la síntesis de proteínas de fase aguda. La síntesis de IL-TIF se induce rápidamente después de la inyección de lipopolisacáridos bacterianos. A diferencia de IL10, IL22 no inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias por monocitos en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos. Tampoco altera la función de IL10 en monocitos. IL-TIF tiene algunos efectos inhibidores en la producción de IL4 de linfocitos T colaboradores Th2.

55 IL10 e IL-TIF utilizan una subunidad de receptor común. Anticuerpos dirigidos contra la cadena beta del receptor de IL10 bloquean la inducción de proteínas de fase aguda por IL-TIF. El complejo del receptor de IL-TIF funcional consiste en dos cadenas de receptor. Una cadena se ha identificado como el receptor CRF2-4 huérfano que se expresa en hígado y riñón normal. La otra cadena es el receptor-2 de IL10, la segunda cadena del complejo del receptor de IL10. COS de mono que expresan CRF2-9 solo responden a IL-TIF. En células de hámster, ambas cadenas deben expresarse para dar receptores de IL-TIF funcionales. Aunque ambas cadenas del receptor pueden

unirse a IL-TIF independientemente, la unión de IL-TIF al complejo de receptor es mayor. Este reparto de subunidades de receptor es similar al uso compartido de la cadena gamma común por citocinas tales como IL2, IL4, IL7, IL9 e IL15. Algunas líneas celulares que no responden a IL10 responden a IL-TIF por activación de STAT-1, STAT-3 y STAT-5.

5 Se ha descrito un receptor secretado soluble (231 aminoácidos), designado IL22BP [proteína de unión a IL22] (Kotenko y col.). La proteína demuestra el 34 por ciento de identidad de aminoácidos con el dominio extracelular de la cadena de IL22R1 y también se conoce como CRF2-10. El gen está mapeado en el cromosoma humano 6q24, 35 kb del gen R1 de IFN-gamma. Se expresa en diversos tejidos con expresión máxima en mama, pulmones y colon. La proteína se une a IL-TIF e inhibe su actividad, bloqueando su interacción con el complejo de receptor de IL22 de la superficie celular y así actúa de antagonista de citocina natural. IL22BP también bloquea la inducción de los supresores de la expresión génica de la señalización-3 de citocinas (SOCS-3) por IL22 en células HepG2 (Dumoutier L y col., Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *Journal of Immunology* 164(4): 1814-1819 (2000); Dumoutier L y col., Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 97(18):10144-9 (2000); Dumoutier L y col., IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 1 (8): 488-494 (2000); Dumoutier L y col., Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *Journal of Immunology* 166(12): 7090-5 (2001); Kotenko SV y col., Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *Journal of Immunology* 166(12): 7096-7103 (2001); Kotenko SV y col., Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* 276(4): 2725-32 (2001); Xie MH y col., Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *Journal of Biological Chemistry* 275(40): 31335-9 (2000).

25 IL-23 es el nombre dado a un factor que está compuesto por la subunidad p40 de IL12 (IL12B) y otra proteína de 19 kDa, designada p19. p19 está estructuralmente relacionada con IL6, G-CSF y la subunidad p35 de IL12. En bases de datos, la subunidad p19 también se encuentra bajo el acrónimo SGRF (factor relacionado con G-CSF de IL6).

p19 por sí misma es biológicamente inactiva, mientras que el complejo de p19 con p40 es activo. El complejo activo es secretado por células dendríticas después de la activación celular.

30 Linfocitos T de memoria de ratón (CD4 (+) CD45 Rb(bajo)) proliferan en respuesta a IL23, pero no en respuesta a IL12. Se ha mostrado que IL23 humana estimula la producción de IFN-gamma por linfocitos T de blastos PHA y linfocitos T de memoria. También induce la proliferación de ambos tipos de células.

IL23 se une a la subunidad beta-1, pero no a la subunidad beta-2 del receptor de IL12, activando una de las proteínas STAT, STAT4, en linfocitos T de blastos PHA.

35 La expresión de p19 en ratones transgénicos conduce a enanismo, inflamación sistémica, infertilidad y muerte antes de los 3 meses de edad. Los animales muestran altas concentraciones en suero de las citocinas pro-inflamatorias TNF-alfa e IL1. El número de neutrófilos en circulación es elevado. Las proteínas de fase aguda se expresan constitutivamente. Animales que expresan p19 específicamente en el hígado no muestran estas anomalías. La expresión de p19 es lo más probablemente debida a células hematopoyéticas ya que el trasplante de células de médula ósea que expresan p19 produce el mismo fenotipo que el observado en los animales transgénicos (Oppmann B y col., Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13(5): 715-25 (2000); Wiekowski MT y col., Ubiquitous Transgenic Expression of the IL-23 Subunit p19 Induces Multiorgan Inflammation, Runting, Infertility, and Premature Death. *Journal of Immunology* 166(12): 7563-70 (2001)).

45 IL24 es un nombre dado a una proteína que también se conoce como ST16 [supresión de tumorigenicidad-16] y MDA-7 [gen 7 asociado a diferenciación de melanoma]. El homólogo de rata de IL24 se ha identificado como mob-5 o C49a. El homólogo murino es FISP.

50 La proteína MDA-7 (206 aminoácidos) se identificó inicialmente como un ADNc asociado a diferenciación de melanoma en un estudio usando células de melanoma humano cultivado que pierden capacidad proliferativa y se diferencian terminalmente en respuesta a IFN-beta humano y mezereína. La expresión de MDA-7 está regulada por incremento como consecuencia de diferenciación terminal. Células de melanoma humano H0-1 y C8161 manipuladas para expresar MDA-7 muestran crecimiento reducido y no forman colonias en un ensayo de formación de colonias. MDA-7 suprime selectivamente el crecimiento de células de cáncer de mama humano promoviendo la muerte celular por apoptosis. La expresión ectópica de MDA-7 por medio de un adenovirus defectuoso en la replicación produce supresión del crecimiento e inducción de apoptosis en un amplio espectro de cánceres adicionales, que incluyen melanoma, glioblastoma multiforme, osteosarcoma y carcinomas de mama, cuello uterino, colon, pulmón, nasofaringe y próstata. No se observan efectos perjudiciales aparentes después de la expresión de MDA-7 en células epiteliales o de fibroblasto normales.

En células hematopoyéticas humanas, la expresión de MDA-7 se induce durante la diferenciación de megacariocitos en respuesta a tratamiento con TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato).

El gen MDA-7 humano está mapeado en el cromosoma 1q32 y está estrechamente ligado (dentro de una región de 195 kb) a los genes que codifican IL10, IL19 e IL20.

- 5 El receptor para IL24 se ha identificado como el complejo del receptor de IL20. Este receptor también se une a IL19 (Blumberg H y col., Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 104(1): 9-19 (2001); Dumoutier L y col., Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *Journal of Immunology* 167(7): 3545-9 (2001); Huang EY y col., Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene* 20(48): 7051-63 (2001); Jiang H y col., Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 11: 2477-2486 (1995); Jiang H y col., The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 93: 9160-9165 (1996); Su Z y col., The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 95: 14400-14405 (1998)).

IL25 (también conocida como SF20) se ha identificado en una búsqueda de factores que estimulan la proliferación celular. El factor es secretado por células de la médula ósea del estroma.

- 20 El receptor de IL25 se ha identificado como antígeno-1 compartido tímico de ratón (TSA-1). La expresión obligatoria del receptor en una de las líneas celulares dependientes de factor, BaF3, que no expresa el receptor produce proliferación celular. Células FDCP2, que expresan el receptor, también proliferan en respuesta a SF20/IL25. En ambos casos, la proliferación es abolida por anticuerpos bloqueantes específicos dirigidos contra el receptor.

- 25 SF20/IL-25 no tiene actividad mielopoyética detectable, pero soporta la proliferación de células en el linaje linfóide (Tulin EE y col., SF20/IL-25, a Novel Bone Marrow Stroma-Derived Growth Factor That Binds to Mouse Thymic Shared Antigen-1 and Supports Lymphoid Cell Proliferation. *Journal of Immunology* 167(11): 6338-47 (2001)).

- 30 Los miembros de la superfamilia de ligandos de TNF (TNF-alfa, TNF-beta, LT beta, ligando CD27, ligando CD30, ligando CD40, ligando CD95, 4 1BB, ligando OX40, TRAIL) comparten actividades biológicas comunes, pero algunas propiedades son compartidas por solo algunos ligandos, mientras que otras son únicas. TNF-alfa humano es una proteína no glicosilada de 17 kDa y una longitud de 157 aminoácidos. TNF-alfa murino está glicosilado en N. la homología con TNF-beta es aproximadamente el 30%. TNF-alfa forma dímeros y trímeros. La forma de 17 kDa del factor se produce por procesamiento de una proteína precursora de 233 aminoácidos. Se ha mostrado que una enzima convertidora de TNF-alfa media en esta conversión. También se ha descrito una forma transmembrana de 26 kDa.

- 35 TNF-alfa contiene un único enlace disulfuro que puede ser destruido sin alterar la actividad biológica del factor. Las mutaciones Ala84 a Val y Val91 a Ala reducen la actividad citotóxica del factor casi completamente. Estos sitios participan en la unión a receptor. La delección de 7 aminoácidos del extremo N y la sustitución de Pro8Ser9Asp10 por ArgLysArg da un factor mutado con una actividad antitumoral aproximadamente 10 veces potenciada y elevada unión a receptor, como se demuestra por el ensayo de células L-M, mientras que al mismo tiempo reduce la toxicidad.

- 40 El gen tiene una longitud de aproximadamente 3,6 kb y contiene cuatro exones. El transcrito primario tiene una longitud de 2762 nucleótidos y codifica una proteína precursora de 233 aminoácidos. Los 78 aminoácidos del extremo amino sirven de presecuencia. El gen humano está mapeado en el cromosoma 6p23-6q12. Se localiza entre la región HLa de la clase I para HLA-B y el gen que codifica el factor del complemento C. El gen que codifica TNF-beta tiene aproximadamente 1,2 kb en la dirección 3' del gen TNF-alfa. Sin embargo, ambos genes se regulan independientemente. Los dos genes también se encuentran próximos entre sí en el cromosoma murino 17.

- 45 Aproximadamente 500-10000 receptores de alta afinidad ($K_a = 2,5 \times 10^{-9}$ M) para TNF-alfa se expresan en todos los tipos de célula somáticas con la excepción de eritrocitos. Se han descrito dos receptores de 55 kDa (TNF-R1; nueva designación: CD120a) (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X55313) y 75 kDa (TNF-R2; nueva designación: CD120b) (por ejemplo, como se describe en Goodwin RG y col., (1991) *Molecular Cellular Biology* 11: 3020-6). Un receptor es una proteína glicosilada de 455 aminoácidos que contiene un dominio extracelular de 171 y un dominio citoplásmico de 221 aminoácidos. Las homologías de secuencia en los dominios ricos en cisteína de la porción extracelular revelan que el receptor está relacionado con el receptor de baja afinidad de NGF y con el antígeno de la superficie celular humano CD40.

- 55 El análisis de la delección en la región intracelular del extremo C del receptor de 55 kDa, TNF-R1, ha revelado la existencia de un llamado dominio de muerte, que participa en los procesos de señalización que conducen a muerte celular programada. El dominio de muerte de TNF-R1 interacciona con una variedad de otras moléculas adaptadoras de la señalización, que incluyen TRADD y RIP.

- Los dos receptores conocidos se unen tanto a TNF-alfa como a TNF-beta. p55 se expresa particularmente en células susceptibles a la acción citotóxica de TNF. p75 también está presente en muchos tipos de células, especialmente aquellas de origen mieloide (un homólogo codificado por virus de la subunidad de receptor es el gen 6 inducido por EBV). Se expresa fuertemente en linfocitos T y linfocitos B estimulados. Las actividades diferenciales de TNF en diversos tipos de células, es decir, actividades promotoras del crecimiento e inhibitoras del crecimiento, están probablemente mediadas por la expresión y/o regulación diferencial de múltiples receptores en combinación con otras proteínas asociadas a receptor distintas. p55 parece desempeñar una función crítica en las defensas del huésped contra microorganismos y sus factores patógenos.
- Un tercer subtipo de receptor se expresa en hígado humano normal. Se une a TNF-alfa, pero no a TNF-beta. Algunos virus contienen genes que codifican proteínas secretadas con propiedades de unión a TNF que son estrechamente homólogas a los receptores de TNF p55 y p75. También se han encontrado efectos diferenciales de los dos subtipos de receptores en la adhesión mediada por TNF de leucocitos al endotelio. Parece que el ajuste del receptor de p55 conduce específicamente a la inducción de las moléculas de adhesión celular ICAM-1, E-selectina, V-CAM-1 y CD44, mientras que el ajuste de tanto el receptor p55 como p75 induce la expresión de alfa-2 integrina.
- También se han encontrado formas solubles truncadas del receptor. Las formas solubles, en particular el dominio extracelular soluble del receptor p60, bloquean los efectos antiproliferativos de TNF y, por tanto, pueden modular los efectos perjudiciales de TNF.
- Las densidades de receptores se reducen por IL1 y promotores tumorales tales como ésteres de forbol. La expresión de la densidad del receptor de TNF-alfa se induce por IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma.
- Los transductores de señales que se asocian con los dominios citoplásmicos de miembros de la superfamilia de receptores de TNF comprenden TRAF (factores asociados a receptor del factor de necrosis tumoral).
- TNF-alfa humano es activo en células murinas con una actividad específica ligeramente reducida. En general, TNF-alfa y TNF-beta muestran espectros similares de actividades biológicas en sistemas *in vitro*, aunque TNF-beta es frecuentemente menos potente o muestra actividad de agonista parcial aparente.
- TNF-alfa muestra un amplio espectro de actividades biológicas. Produce la citólisis y citostasis de muchas líneas celulares tumorales *in vitro*. Células sensibles mueren en el plazo de horas después de la exposición a concentraciones picomolares del factor y esto implica, al menos en parte, moléculas de segundo mensajero derivadas de mitocondrias que sirven de mediadores comunes de rutas de señalización citotóxicas de TNF y reguladoras de genes. El factor induce necrosis hemorrágica de tumores trasplantados. En el plazo de horas después de la inyección, TNF-alfa conduce a la destrucción de pequeños vasos sanguíneos dentro de tumores malignos. El factor también potencia la fagocitosis y citotoxicidad en granulocitos neutrófilos y también modula la expresión de muchas otras proteínas, que incluyen fos, myc, IL1 e IL6.
- La forma de 26 kDa de TNF se encuentra predominantemente en monocitos y linfocitos T activados. También es biológicamente activa y media en la destrucción celular por contactos célula a célula directos.
- Las propiedades quimiotácticas de fMLP (formil-Met-Leu-Phe) para neutrófilos están potenciadas por TNF-alfa. TNF-alfa induce la síntesis de varias citocinas quimioatrayentes, que incluyen IP-10, JE, KC, en un modo específico de célula y de tejido.
- TNF-alfa es un factor de crecimiento para fibroblastos diploides humanos normales. Promueve la síntesis de colagenasa y prostaglandina E2 en fibroblastos. También puede servir de modulador del crecimiento autocrino para células de leucemia linfocítica crónica humana *in vivo* y se ha descrito que es un modulador del crecimiento autocrino para células de neuroblastoma. La actividad promotora del crecimiento autocrino se inhibe por IL4.
- En macrófagos en reposo, TNF induce la síntesis de IL1 y prostaglandina E2. También estimula la fagocitosis y la síntesis de superóxido dismutasa en macrófagos. TNF activa osteoclastos y así induce resorción ósea.
- En progenitores de leucocitos y linfocitos, TNF estimula la expresión de HLA de clase I y II y antígenos de diferenciación, y la producción de IL1, factores estimulantes de colonias, IFN-gamma y metabolismo del ácido araquidónico. También estimula la biosíntesis de colagenasas en células endoteliales y células sinoviales.
- IL6 suprime la síntesis de IL1 inducida por endotoxinas bacterianas y TNF, y la síntesis de TNF inducida por endotoxinas.
- El neurotransmisor SP (sustancia P) induce la síntesis de TNF e IL1 en macrófagos. IL1, al igual que IL6, estimula la síntesis de ACTH (corticotropina) en la pituitaria. Los glucocorticoides sintetizados en respuesta a ACTH inhiben a su vez la síntesis de IL6, IL1 y TNF *in vivo*, estableciendo así un bucle de retroalimentación negativo entre el sistema inmunitario y funciones neuroendocrinas.
- TNF-alfa potencia la proliferación de linfocitos T inducida por diversos estímulos en ausencia de IL2. Algunas subpoblaciones de linfocitos T solo responden a IL2 en presencia de TNF-alfa. En presencia de IL2, TNF-alfa

promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B.

Las capacidades funcionales de células de Langerhans de la piel también están influidas por TNF-alfa. Estas células no pueden iniciar respuestas inmunitarias primarias tales como sensibilización de contacto. Se convierten en células dendríticas inmunoestimulantes por GM-CSF y también IL1. Por tanto, estas células son un depósito para células dendríticas linfoides inmunológicamente inmaduras. La capacidad potenciada de células de Langerhans maduras para procesar antígenos es significativamente reducida por TNF-alfa.

Aunque TNF-alfa también se requiere para respuestas inmunitarias normales, la expresión en exceso tiene graves consecuencias patológicas. TNF-alfa es el principal mediador de caquexia observada en pacientes con tumor (de ahí su nombre, caquectina). TNF también es responsable de algunos de los graves efectos durante septicemia por Gram-negativas.

TNF-alfa puede detectarse en bioensayos que implican líneas celulares que responden a él (por ejemplo, BT-20, CT6, EL4; PK15; L929; L-M; MO7E; T1165; WEHI-3B). TNF-alfa puede detectarse también por un inmunoensayo enzimático tipo sándwich sensible, ELISA, un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) y por un ensayo designado RELAY (ensayo de transferencia de marca mediada por receptor). El factor intracelular se detecta por citometría de flujo por inmunofluorescencia de dos colores. Higuchi y col. han descrito un ensayo basado en la liberación de timidina tritiada de células que experimentan apoptosis después de tratamiento con tanto TNF-alfa como TNF-beta. Se ha mostrado que IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, TGF-beta, IL4, LIF y GM-CSF no interfieren con este ensayo.

A diferencia de quimiofármacos terapéuticos, TNF ataca específicamente células malignas. Amplios estudios preclínicos han documentado un efecto citostático y citotóxico directo de TNF-alfa contra xenoinjertos humanos subcutáneos y metástasis de ganglios linfáticos en ratones sin pelo, además de una variedad de efectos inmunomoduladores sobre diversas células efectoras inmunes, que incluyen neutrófilos, macrófagos y linfocitos T. Estudios de fase I de dosis única y de múltiples dosis han confirmado que TNF puede administrarse con seguridad a pacientes con tumores malignos avanzados en un intervalo de dosis asociado a efecto antineoplásico sin toxicidades graves concomitantes tales como choque y caquexia. Sin embargo, ensayos clínicos en su conjunto han fracasado desafortunadamente hasta la fecha en demostrar mejoras significativas en el tratamiento del cáncer, siendo la toxicidad sistémica inducida por TNF una limitación importante para el uso de TNF como agente antineoplásico en la mayoría de los casos. El uso combinado de TNF y agentes moduladores citotóxicos o inmunes, particularmente IFN-gamma y posiblemente IL2, puede ser ventajoso en el tratamiento de algunos tumores. En algunos casos se ha encontrado que la aplicación intratumoral de TNF es de ventaja en el control tumoral.

Algunas formas mutantes de TNF-beta con actividad selectiva en el receptor p55 se han descrito recientemente. Se ha mostrado que la activación del receptor p55 es suficiente para desencadenar actividad citotóxica hacia células transformadas. Se ha descrito que algunos de estos mutantes retienen su actividad antitumoral en ratones sin pelo que llevan tumores humanos trasplantados.

TNF también puede usarse para aumentar la agresividad de células asesinas activadas por linfocinas. Estudios con un modelo de metástasis de fibrosarcoma experimental han mostrado que TNF induce mejora significativa del número de metástasis en el pulmón. Se ha sugerido que bajas dosis de TNF endógeno o administración de TNF durante terapia con citocinas puede potenciar el potencial metastásico de células tumorales en circulación. Se ha mostrado que la transducción de células murinas tumorales con un gen TNF-alfa funcional conduce al rechazo de las células genéticamente modificadas por huéspedes singeneicos.

Los interferones son una familia de citocinas que inducen un estado antiviral no específico para virus en células diana. La unión de un interferón a su receptor induce la nueva síntesis de proteínas que, a su vez, produce la inactivación del factor de iniciación eIF-2. Se cree que la inactivación contribuye al estado antiviral inducido por los interferones. Los interferones también inducen rutas que activan endonucleasas intracelulares que degradan ARNm viral. Muchos interferones también poseen actividades inmunomoduladoras, tales como activación de macrófagos y linfocitos. Ejemplos de interferones incluyen IFN-gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank K01900, J00209, M12350, J00213, J00216, J00214, M11003, M11026, M34913, M54886, X01974, L38698, M13710, K01238, M13660, M68944, X01972, X01971, X01973, X01969), IFN-gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M28622, X14029, X14455, K00020, J00218, E00171, X04430, A09363, M27327, M16656, M25460, K03196), IFN-gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank A34532, X87308, E00756, K00083), IFN-gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X58822, A12140), proteína-1 de trofoblastos bovinos (IFN-gamma), por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M31556, M31557, M31558), y sus homólogos entre especies. Se cree que IFN-gamma e IFN-gamma humana se unen a un receptor común (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X60459, M89641) que es distinto del receptor para IFN-gamma (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank J03143, M28233).

Se conocen al menos 23 variantes diferentes de IFN-alfa. Las proteínas individuales tienen masas moleculares entre 19-26 kDa y consisten en proteínas con longitudes de 156-166 y 172 aminoácidos. Todos los subtipos de IFN-alfa poseen una región de secuencias conservadas común entre las posiciones de aminoácidos 115-151 mientras que los extremos amino son variables. Muchos subtipos de IFN-alfa se diferencian en sus secuencias en solo una o dos

posiciones. Las variantes que se producen naturalmente también incluyen proteínas truncadas por 10 aminoácidos en el extremo carboxi. Los enlaces disulfuro se forman entre cisteínas en las posiciones 1/98 y 29/138. El enlace disulfuro 29/138 es esencial para la actividad biológica, mientras que el enlace 1/98 puede reducirse sin afectar la bioactividad.

5 IFN-beta humano es una glicoproteína (aproximadamente 20% de resto de azúcar) de 20 kDa y tiene una longitud de 166 aminoácidos. La glicosilación no se requiere para actividad biológica *in vitro*. La proteína contiene un enlace disulfuro (Cys31/141) requerido para actividad biológica. Al nivel de ADN, IFN-beta muestra el 34% de homología de secuencias con IFN-beta-2 y aproximadamente el 30% de homología con otros subtipos de IFN-alfa. A diferencia de IFN-gamma, IFN-beta es estable a pH2.

10 IFN-gamma humana es una proteína dímera con subunidades de 146 aminoácidos. La proteína está glicosilada en dos sitios. El pI es 8,3-8,5. IFN-gamma se sintetiza como una proteína precursora de 166 aminoácidos que incluye una secuencia señal secretora de 23 aminoácidos. Se han descrito dos formas moleculares de la proteína biológicamente activa de 20 y 25 kDa. Ambas están glicosiladas en la posición 25. La forma de 25 kDa también está glicosilada en la posición 97. Las diferencias observadas de IFN-gamma natural con respecto a la masa molecular y carga son debidas a patrones de glicosilación variables. Las formas de 40-60 kDa observadas bajo condiciones no desnaturizantes son dímeros y tetrámeros de IFN-gamma.

Miembros de la familia de CSF de citocinas permiten el crecimiento y diferenciación de células de la médula ósea inmovilizadas sobre agar blando o metilcelulosa. Mientras que las células progenitoras hematopoyéticas pueden mantenerse solo durante cortos periodos de tiempo en ausencia de tales factores, su presencia permite el desarrollo de colonias que contienen células eritroides, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y/o megacariocitos, dependiendo del factor particular. El análisis bioquímico de diversas actividades que estimulan la formación de colonias que soporta el crecimiento y desarrollo de estos tipos de células reveló que existen muchos factores diferentes y distintos de este tipo.

20 Muchos de estos factores están tanto N- como O-glicosilados. Se ha mostrado que la glicosilación potencia la solubilidad, estabilidad y resistencia a enzimas proteolíticas. No parece ser requerida para el completo espectro de actividades biológicas de estos factores. Los genes que codifican muchos de los factores estimulantes de colonias humanas se han clonado y mapeado. Algunos de los genes están en estrecha vecindad, pero no muestran gran homología entre sí, con la excepción de algunas regiones conservadas.

30 Los factores estimulantes de colonias se producen por muchos tipos de células diferentes, que incluyen, por ejemplo, linfocitos B, células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, línea celular del estroma, linfocitos T. Se sintetizan como moléculas precursoras que contienen una secuencia señal secretora hidrófoba clásica de aproximadamente 25-32 aminoácidos. Los factores secretados que tienen una actividad biológica específica extremadamente alta son activos a concentraciones muy bajas (1-100 pM). Estos factores son absolutamente requeridos para la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas. Las concentraciones requeridas para el mero mantenimiento de la viabilidad son normalmente órdenes de magnitud inferiores a aquellos requeridos para inducir la proliferación celular o para provocar actividades funcionales específicas de las células.

35 Los nombres de los factores individuales normalmente indican los tipos de células que responden a estos factores. Los factores estimulantes de colonias clásicos incluyen M-CSF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de Genbank: E03235, M64592, U22386, X05010) (específico de macrófagos), G-CSF (específico de granulocitos), GM-CSF (específico de macrófagos/granulocitos), IL3 (multifuncional) y MEG-CSF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D86370, U70136) (específico de megacariocitos). G-CSF y M-CSF son específicos de linaje mientras que GM-CSF e IL3 son factores de crecimiento hematopoyéticos multifuncionales que actúan en etapas más tempranas de la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas.

40 GM-CSF humano es una proteína monomérica de 127 aminoácidos con dos sitios de glicosilación. La proteína se sintetiza con un precursor de 144 aminoácidos, que incluye una secuencia señal secretora hidrófoba en el extremo amino. El resto de azúcar no es requerido para el espectro completo de actividades biológicas. GM-CSF no glicosilado y glicosilado muestra las mismas actividades *in vitro*. GM-CSF completamente glicosilado es biológicamente más activo *in vivo* que la proteína no glicosilada. Las formas de diferente peso molecular de GM-CSF (14 kDa, 35 kDa) descritas en la bibliografía son el resultado de grados de glicosilación variables. GM-CSF contiene cuatro residuos de cisteína (posiciones 54/96 y 88/121).

45 Una comparación de la secuencia de proteínas de GM-CSF con la de los otros factores estimulantes de colonias revela que no son fuertemente homólogos entre sí. GM-CSF humano y murino muestran el 60% de homología al nivel de proteínas y el 70% al nivel de nucleótidos. Sin embargo, los dos factores no reaccionan de forma cruzada inmunológicamente. GM-CSF puede asociarse a la matriz extracelular de células como un complejo con proteoglicanos de sulfato de heparano. Esto permite el almacenamiento del factor en una forma biológicamente inactiva. No se conoce el mecanismo exacto por el que el factor es eventualmente liberado de estos depósitos.

55 El gen humano tiene una longitud de aproximadamente 2,5 kb y contiene cuatro exones. La distancia entre el gen GM-CSF y el gen IL3 es aproximadamente 9 kb. El gen GM-CSF humano está mapeado en el cromosoma 5q22-31

en la vecindad de otros genes que codifican factores de crecimiento hematopoyéticos (M-CSF, IL3, IL4, IL5) y el gen que codifica el receptor de M-CSF. La región 5' del gen GM-CSF contiene varios elementos de secuencia conocidos como CLE (elemento de linfocina conservado). Sirven de sitios de unión para factores de transcripción, modulando la expresión del gen GM-CSF.

- 5 Los receptores de GM-CSF se expresan a densidades de varios 100 a varios 1000 de copias/célula sobre la superficie celular de células mieloides. El receptor se expresa también en células no hematopoyéticas tales como células endoteliales y células de carcinoma de pulmón de células pequeñas. En linajes celulares positivos para receptor, la densidad del receptor disminuye con grados crecientes de maduración.

10 El receptor muestra significativas homologías con otros receptores para factores de crecimiento hematopoyéticos, que incluyen IL2-beta, IL3, IL6, IL7, Epo y los receptores de prolactina. Una subunidad clonada del receptor de GM-CSF (GM-R alfa, 45 kDa) se une a GM-CSF con baja afinidad (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank SEG_HUMGRAS). La segunda subunidad (GM-R beta, 120 kDa) no se une a GM-CSF. GM-R alfa es una proteína de 400 aminoácidos que contiene solo un dominio citoplásmico corto de 54 aminoácidos. El receptor de GM-CSF de alta afinidad se forma por la agregación de las dos subunidades de receptor. La subunidad beta de GM-R del receptor (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank SEG_MUSAIC2B, M59941) también es un constituyente de otros sistemas de receptor de citocina. Es un componente de los receptores de alta afinidad para IL3 e IL5, ambos de los cuales también contienen una subunidad específica de citocina (AIC2A).

20 GM-CSF humano no es activo en células murinas y viceversa. GM-CSF se aisló inicialmente como un factor estimulante del crecimiento de colonias que contienen macrófagos/granulocitos en cultivos de agar blando (ensayo de formación de colonias). GM-CSF es indispensable para el crecimiento y desarrollo de células progenitoras de granulocitos y macrófagos. Estimula mieloblastos y monoblastos y desencadena la diferenciación irreversible de estas células. GM-CSF sinergiza con Epo en la proliferación de células progenitoras eritroides y megacariocíticas. En combinación con otro factor estimulante de colonias, M-CSF, se observa el fenómeno de supresión sinérgica, es decir, la combinación de estos dos factores conduce a una supresión parcial de la generación de colonias de células que contienen macrófagos.

30 Para algunos tipos de blastocitos de pacientes con leucemia mieloide aguda, GM-CSF actúa de mediador autocrino del crecimiento. GM-CSF es un fuerte quimioatrayente para neutrófilos. Potencia la actividad microbicida, metabolismo oxidativo y actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos. También mejora la citotoxicidad de estas células. GM-CSF muestra una especificidad menos pronunciada que, por ejemplo, G-CSF. Estimula la proliferación y diferenciación de linajes neutrofilicos, eosinofilicos y monocíticos. También activa funcionalmente las formas maduras correspondientes, potenciando, por ejemplo, la expresión de ciertas proteínas de adhesión de la superficie celular (CD-11A, CD-11C). La expresión en exceso de estas proteínas podría ser una explicación para la acumulación local observada de granulocitos en sitios de inflamación. Además, GM-CSF también potencia la expresión de receptores para fMLP (formil-Met-Leu-Phe), que es un estimulante de la actividad de neutrófilos.

35 A concentraciones pico a nanomolares, GM-CSF es quimiotáctico para eosinófilos y también influye en el comportamiento quimiotáctico de estas células en respuesta a otros factores quimiotácticos.

40 En granulocitos, GM-CSF estimula la liberación de metabolitos de ácido araquidónico y la elevada generación de especies de oxígeno reactivas. La activación del sistema contratransportador de Na⁺/H⁺ conduce a una rápida alcalinización del citosol. Las actividades fagocíticas de granulocitos neutrófilos y la citotoxicidad de eosinófilos también son potenciadas considerablemente por GM-CSF. Como GM-CSF se produce por células (linfocitos T, macrófagos de tejido, células endoteliales, mastocitos) presentes en sitios de respuestas inflamatorias, puede asumirse que es un importante mediador para reacciones inflamatorias.

45 El estado funcional de células de Langerhans de la piel también está influido por GM-CSF. Estas células no pueden iniciar respuestas inmunitarias primarias, por ejemplo, sensibilización de contacto. Se convierten en células dendríticas inmunoestimulantes altamente potentes por GM-CSF (y también IL1). Por tanto, las células de Langerhans forman un depósito *in situ* para células dendríticas linfoides inmunológicamente inmaduras. La maduración de estas células que se observa como elevada capacidad para procesar antígenos puede regularse por disminución por TNF-alfa.

50 A concentraciones nanomolares, GM-CSF induce la expresión de receptores del complemento C3a en basófilos. Células que normalmente no responden a C3a y que se han activado por GM-CSF se desgranulan en respuesta al estímulo de C3a. Esto va acompañado de la liberación de histamina y leucotrieno C4. Este proceso puede ser de significancia en reacciones de hipersensibilidad asociadas a respuestas inflamatorias (linfocitos T, macrófagos de tejido, células endoteliales, mastocitos). Se ha mostrado que GM-CSF también es un potente inductor de interferón de trofoblasto (TP-1).

55 GM-CSF sinergiza con algunas otras citocinas, que incluyen IL1, IL3 y G-CSF. GM-CSF y G-CSF deben actuar sincronizadas para permitir el desarrollo de colonias que contienen neutrófilos *in vitro*.

IL3 por sí sola expande insignificativamente el número de glóbulos sanguíneos en circulación; sin embargo, una dosis posterior de GM-CSF, aumenta significativamente los números de células, probablemente debido a que IL3 conduce primero a una expansión de aquellas células que pueden responder a GM-CSF.

5 Las observaciones de que la mayoría de las líneas celulares dependientes de IL3 también pueden crecer en presencia de GM-CSF e IL4 y que varios efectos sinérgicos se observan entre GM-CSF e IL4 sugieren que estos tres factores realizan funciones similares en controlar el crecimiento de células. Hay algunas indicaciones de que el mecanismo de transducción de señales contiene al menos algunos factores comunes.

10 Experimentos con proteínas cinasas específicas de tirosina codificadas por un oncogén han mostrado que la expresión de esta actividad de cinasa en células dependientes de factor abole su dependencia de GM-CSF, IL3 e IL4. El mecanismo exacto por el que estos factores regulan la proliferación y diferenciación de células es todavía desconocido.

15 Las consecuencias de una expresión desregulada de GM-CSF se han estudiado en ratones transgénicos que alojan un gen GM-CSF constitutivamente expresado. La expresión en exceso del transgén que codifica GM-CSF conduce a alteraciones patológicas en la retina y produce ceguera y también produce deterioro muscular. Estos ratones se caracterizan por un aumento muy pronunciado en macrófagos activados. Además, la expresión en exceso de GM-CSF conduce a la activación de macrófagos maduros que secretan grandes cantidades de IL1 y TNF, sugiriendo que estas citocinas pueden ser responsables de algunos aspectos de la enfermedad del ratón transgénico.

20 El examen histopatológico demuestra un aumento pronunciado en la población de células progenitoras del linaje monocítico. Animales transgénicos para GM-CSF normalmente mueren en el plazo de meses desde la lesión de tejido masiva resultante de la expresión en exceso de estos factores. Se han obtenido resultados similares con ratones que poseen una médula ósea manipulada para expresar en exceso GM-CSF por transformación con vectores de retrovirus adecuados. Aunque estos hallazgos no parecen ser de significancia clínica. El tratamiento a largo plazo de primates y ratones con GM-CSF ha mostrado que no se producen complicaciones potencialmente mortales.

25 Las consecuencias biológicas de la alteración del gen GM-CSF se han estudiado en ratones generados a partir de células ES que llevan una delección elegida como diana del gen. Ratones homocigóticos para una alteración elegida como diana del gen GM-CSF se caracterizan por una hematopoyesis en estado estacionario sin alterar, que demuestra que GM-CSF no es esencial para mantener niveles normales de los principales tipos de células hematopoyéticas maduras y sus precursores en sangre, médula ósea y bazo.

30 La mayoría de los ratones deficientes en GM-CSF son superficialmente sanos y fértiles, pero desarrollan pulmones anormales. Los ratones deficientes en GM-CSF desarrollan una acumulación progresiva de lípidos y proteínas tensioactivas en el espacio alveolar, las características definitorias del trastorno humano idiopático proteinosis alveolar pulmonar. También se encuentra amplia hiperplasia linfoide asociada a vías respiratorias pulmonares y vasos sanguíneos. Estos resultados demuestran una inesperada función crítica para GM-CSF en homeostasis pulmonar.

35 Ratones transgénicos homocigóticos para mutaciones nulas del gen que codifica la subunidad beta común (beta C) de complejos de receptores de GM-CSF, IL3 e IL5 presentan desarrollo normal y sobreviven hasta la adultez joven. Desarrollan infiltrados linfoides peribroncovasculares pulmonares y áreas que se parecen a proteinosis alveolar. Los números de eosinófilos en sangre periférica y médula ósea de mutantes de delección homocigóticos se reducen, mientras que otros parámetros hematológicos son normales. Las células de la médula ósea de mutantes de delección homocigóticos no muestran unión de alta afinidad de GM-CSF, mientras que las células de animales heterocigóticos muestran un número intermedio de receptores de alta afinidad. En cultivos clónicos de células de médula ósea derivadas de mutantes de delección homocigóticos, incluso altas concentraciones de GM-CSF e IL5 no estimulan la formación de colonias en el ensayo de formación de colonias. No se observan diferencias en la eliminación sistémica y distribución de GM-CSF entre compañeros de camada mutantes y no mutantes.

40 Nishinakamura y col., han cruzado ratones mutantes para beta-c con ratones deficientes para IL3. Los ratones de doble mutante que carecen de todas las funciones de IL3, GM-CSF e IL5 son evidentemente normalmente fértiles. Los animales muestran los mismos números de eosinófilos reducidos y una falta de respuesta eosinofílica a parásitos como ratones mutantes para beta-c. La respuesta inmunitaria de los ratones de doble mutante a *Listeria monocytogenes* es normal. La recuperación hematopoyética después del tratamiento con fluorouracilo también es normal. Estos hallazgos sugieren la existencia de mecanismo alternativo para producir glóbulos sanguíneos que no dependen de la presencia de IL3, GM-CSF e IL5.

45 GM-CSF puede ensayarse en un ensayo de formación de colonias por el desarrollo de colonias que contienen macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y megacariocitos. GM-CSF también se detecta en bioensayos específicos con líneas celulares que dependen en su crecimiento de la presencia de GM-CSF o que responden a este factor (por ejemplo, AML-193; B6Sut-A; BAC1.2F5; BCL1; Da; FDCP1; GF-D8; GM/SO; IC-2; MO7E; NFS-60; PT-18; TALL-103; TF-1; UT-7).

GM-CSF puede emplearse para la reconstitución fisiológica de hematopoyesis en todas las enfermedades caracterizadas tanto por una maduración anómala de glóbulos sanguíneos como por una producción reducida de leucocitos. La principal aplicación clínica y más importante de GM-CSF es probablemente el tratamiento de neutropenia potencialmente mortal tras quimio y/o radioterapia, que es sustancialmente reducido bajo tratamiento con GM-CSF. GM-CSF también puede usarse para corregir citopenias inducidas por quimioterapia y para contrarrestar predisposición relacionada con citopenia a infecciones y hemorragias.

Con el fin de prevenir posibles complicaciones tras la administración de GM-CSF, se requiere cuidadosa monitorización clínica en ciertos grupos de pacientes, por ejemplo, aquellos con síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda, enfermedad inflamatoria, trombocitopenia autoinmune o sensibilidad inmunológica de mal funcionamiento.

Varios estudios han demostrado que el uso de GM-CSF potencia la tolerancia a tratamiento con fármacos citotóxicos y puede usarse para prevenir reducciones de dosis necesitadas por los efectos secundarios del tratamiento con fármacos citotóxicos. El tratamiento de GM-CSF frecuentemente permite aumentar las dosis de fármacos citotóxicos por ciclo. Estos estudios también han revelado una morbilidad significativamente reducida bajo tratamiento con GM-CSF.

Se ha mostrado que la transducción de células murinas tumorales con un gen GM-CSF funcional conduce al rechazo de las células genéticamente modificadas por huéspedes singeneicos. Además, la vacunación con células tumorales transducidas con GM-CSF previene el crecimiento de un inóculo posterior de células tumorales singeneicas no mutantes.

La familia de quimiocinas de citocinas consiste en polipéptidos relativamente pequeños estructuralmente similares que inducen quimiotaxia en leucocitos. Las quimiocinas tienen masas moleculares de 8-10 kDa y muestran aproximadamente el 20-50% de homología de secuencias entre sí al nivel de proteínas. Las proteínas también comparten estructuras génicas comunes y estructuras terciarias. Todas las quimiocinas poseen varios residuos de cisteína conservados que participan en la formación de enlace disulfuro intramolecular.

Según las localizaciones cromosómicas de genes individuales se distinguen dos subfamilias diferentes de quimiocinas. Los miembros de las alfa-quimiocinas también se denominan la familia de quimiocinas 4q debido a que los genes que codifican miembros de esta familia se mapean en el cromosoma humano 4q12-21. Los dos primeros residuos de cisteína de los miembros de esta familia están separados por un único aminoácido y, por tanto, estas proteínas también se llaman quimiocinas C-X-C. Esta subfamilia incluye 9E3 (por ejemplo, proteína de GenBank P08317), AMCF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M99367, M99368), beta-tromboglobulina (por ejemplo, como se ha divulgado en Begg GS y col., (1978), *Biochemistry* 17: 1739-44), miembros de la familia CINC (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D21095), ENA-78 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X78686), eotaxina (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U46572, U40672), GCP-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank Y08770, U83303), IL8, IP-10 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L07417, X02530), KC (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank J04596), LIX (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U27267), mig (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M34815, Z24725), MGSA (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X12510), mob-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U 17035), NAP-2 (como se describe en Clark-Lewis I y col., (1991) *Biochemistry* 30: 3128-35, Cohen AB y col., (1992) *American Journal of Physiology* 263: L249-56), NAP-3 (como se describe en Schröder JM y col., (1991) *Journal of Experimental Medicine* 171: 1091-100), NAP-4 (como se describe en Schröder JM y col., (1990) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172: 898-904), PBSF (SDF) (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D21072, U16752, D50645) y PF4 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M25897).

IL8, MGSA, KC de ratón, MIP-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X65647 y como se describen en Blum S y col., Three human homologues of a murine gene encoding an inhibitor of stem cell proliferation. *DNA Cell Biol.* 9: 589-602 (1990); Clements JM y col., Biological and structural properties of MIP-1 alpha expressed in yeast. *Cytokine* 4: 76-82 (1992); Devatellis G y col., Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *Journal of Experimental Medicine* 167: 1939-44 (1988) (errata in *JEM* 170: 2189 (1989)); Farber JM A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 87: 5238-42 (1990); Haskill S y col., Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 87: 7732-6 (1990); Poltorak AN y col., (1995) *Journal of Inflammation* 45(3): 207-19; Rossi DL y col., (1997) *Journal of Immunology* 158(3): 1033-1036; Sherry B y col., (1988) *Journal of Experimental Medicine* 168: 2251-9; Tekamp-Olson P y col., (1990) *Journal of Experimental Medicine* 172: 911-9; Wolpe SD y col., (1989) *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 86: 612-16; Wolpe SD y col., (1989) *FASEB Journal* 3: 2565-73), NAP-2, ENA-78 y GCP-2 comprenden un subgrupo de las quimiocinas C-X-C humanas definido por el motivo de secuencia de ELR conservado (ácido glutámico-leucina-arginina) inmediatamente precedente al primer residuo de cisteína próximo al extremo amino. Se ha encontrado que las quimiocinas con una motivo de secuencia de ELR quimioatraen

y activan principalmente neutrófilos. Las quimiocinas sin el motivo de secuencia de ELR parecen quimioatraer y activar monocitos, células dendríticas, linfocitos T, células NK, linfocitos B, basófilos y eosinófilos.

Miembros de las beta-quimiocinas o familia de quimiocinas 17q se mapean en el cromosoma humano 17q11-32 (el cromosoma murino 11). Los dos primeros residuos de cisteína están adyacentes y, por tanto, estas proteínas se llaman también quimiocinas C-C. Esta subfamilia incluye ACT-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank J04130), C10 (por ejemplo, como se describen en Berger MS y col., (1993) DNA Cell Biol. 12: 839-47; Berger MS y col., (1996) 8: 439-447), CCF18 (por ejemplo, como se describe en Hara T y col., (1995) Journal of Immunology 155: 5352-8), DC-CK1 (por ejemplo, como se describe en Adema GJ y col., (1997) Nature 387: 713-717), ELC (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank AB000887, AF059208), eotaxina-2 (por ejemplo, como se describe en Forssmann U y col., (1997) Journal of Experimental Medicine 185: 2171-2176), exodus (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U64197, U88320, U88321, U88322), FIC (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L04694), GDCF y GDCF-2 (por ejemplo, como se describe en Kuratsu J y col., (1989) Journal of the National Cancer Institute 81: 347-51; Yoshimura T y col., (1989) Journal of Experimental Medicine 169: 1449-59; Yoshimura T y col., (1989) Journal of Immunology 142: 1956-62), HC-21 (por ejemplo, como se describe en Chang HC & Reinherz EL (1989) European Journal of Immunology 19:1045-1051), HCC-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank Z49270), I-309 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M57502), JE (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank AF058786, M28226), LAG-1 (gen-1 de activación de linfocitos) (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X53683), LARC D86955), LD78 E03130, E03131, MARC (por ejemplo, como se describen en Thirion S y col., (1994) Biochemical and Biophysical Research Communications 201: 493-499), MCAF M24545 y como se describen en Apella E y col., (1990) Progress in Clinical and Biological Research 349: 405-17), MCP-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X14768), MCP-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank Y16645), MCP-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X72308, S71251), MCP-4 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X98306), MCP-5 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U50712), MIP (proteína inflamatoria de macrófagos) (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U77180, U77035, U49513, M35590), MRP-2 (por ejemplo, como se describe en Youn BS y col., (1995) Journal of Immunology 155: 2661-7), RANTES SDF (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M21121, M77747), TARC (por ejemplo, proteína del nº de acceso de Genbank Q92583).

Además, hay varios otros factores que están relacionados con las quimiocinas, pero que tanto todavía no han sido asignados a uno de los dos grupos de quimiocinas como que no poseen las características clásicas de cualquiera de los dos grupos de quimiocinas (por ejemplo, ATAC (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X86474), Ltn (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U15607, U23772), SCM-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D63789, D63790, D43769). Éstas se han denominado quimiocinas de tipo C o gamma-quimiocinas.

Todavía se ha identificado otro grupo de quimiocinas que comprende neurotactina (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank AF010586, que se caracteriza por un motivo distintivo de cisteína CX(3)C. La existencia de subgrupos claramente definidos de quimiocinas basándose en propiedades estructurales y funcionales ilustra la importancia de la diversidad de quimioatrayentes en la regulación del movimiento de leucocitos por el cuerpo.

Las actividades biológicas de quimiocinas están mediadas por receptores específicos y también por receptores con especificidades de ligando solapantes que se unen a varias de estas proteínas que siempre pertenecen tanto a las quimiocinas C-C como al grupo de quimiocinas C-X-C. Los receptores de quimiocinas pertenecen al gran grupo de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G que contienen siete segmentos alfa-helicoidales hidrófobos que atraviesan la membrana. Estos receptores forman un grupo estructuralmente relacionado dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G que median en la señalización mediante proteínas G heterotrimeras.

Los receptores que se unen a quimiocinas C-X-C se designan CXCR, seguido de un número (por ejemplo, CXCR-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L19591), CXCR-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank M94582), CXCR-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X95876), CXCR-4 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank D87747, AF025375), mientras que aquellos que se unen a quimiocinas C-C se designan CCR, seguido de un número (por ejemplo, CCR-1 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L09230, U29678), CCR-2 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U29677, U95626), CCR-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U51241), CCR-4 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank X90862, X85740), CCR-5 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U54994, U83327), CCR-6 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank U95626), CCR-7 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank L31581), CCR-8 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de GenBank Z98206, U45983). Homólogos de receptores de quimiocinas virales incluyen ECRF-3, EBI-1 (gen-1 inducido por EBV) y US28.

Ahora se ha asumido que los efectos combinatorios de múltiples quimiocinas y otros mediadores son responsables de la composición celular en sitios inflamatorios. Además, muchas quimiocinas también activan directamente células. Algunas de ellas activan granulocitos y/o monocitos y producen estallidos respiratorios, desgranulación y la liberación de enzimas lisosómicas. Otras células inmunitarias principales responden a cantidades sub-óptimas de otros mediadores inflamatorios. Se ha mostrado que todavía otros son potentes factores de liberación de histaminas para basófilos. Se ha propuesto que los eritrocitos mediante su receptor de quimiocinas promiscuo desempeñan una función importante en la regulación de la red de quimiocinas. Se sabe que las quimiocinas unidas al receptor de eritrocitos están inaccesibles a sus células diana normales. Esto parece proporcionar una disminución de quimiocinas superfluas y puede servir para limitar los efectos sistémicos de estos mediadores sin alterar procesos localizados que tienen lugar en el sitio de inflamación.

Ciertas quimiocinas C-C presentan actividades biológicas distintas de la mera quimiotaxia. Se ha mostrado que algunas quimiocinas pueden inducir la proliferación y activación de células asesinas conocidas como CHAK (asesino activado por quimiocinas C-C), que son similares a células activadas por IL2.

Otra citocina es el ligando flt-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de Genbank U04806, U04807, U03858, L23636, U29874, U29875, U44024). Esta citocina se une a la tirosina cinasa flt-3 (por ejemplo, polipéptidos codificados por el nº de acceso de Genbank Z26652, X59398). El ligando flt-3 humano también estimula la proliferación de células que expresan receptores de flt-3 murinos.

Los efectos del ligando de flt-3 se sinergizan por coexpresión de G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL3, PIXY-321 y SCF. En combinación con SCF e IL3, el ligando flt-3 puede producir la expansión de células con el espectro de marcador CD34 (+)CD38 (-). Solo el ligando flt-3 soporta la supervivencia de tipos de células precursoras en el linaje de células formadoras de sangre tales como CFU-GM, CFU-GEMM, y las posibles células formadoras de colonias muy primitivas altamente proliferativas. El ligando flt-3 solo tiene efectos marginales sobre células progenitoras eritroides y de megacariocito.

En el ratón, el ligando flt-3 potencia posiblemente el crecimiento de diversos tipos de células progenitoras/precursoras en sinergia con G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL3, IL6, IL7, IL11, IL12 y SCF. El ligando flt-3 soporta el crecimiento de LTC-IC (células iniciadoras del cultivo a largo plazo cultivo). La capacidad del ligando flt-3 para promover la supervivencia de células progenitoras hematopoyéticas es abolida por TGF-beta y contrarrestada por TNF-alfa.

Un estudio de la expresión de receptor de flt-3 funcional y las respuestas al ligando en LMA (leucemia mieloide aguda) y LLA (leucemia linfoblástica aguda) muestra una heterogeneidad considerable. BCP-ALL en particular deja de proliferar en presencia del ligando flt-3 a pesar de la fuerte expresión del receptor de flt-3 de superficie.

Se ha mostrado que en pacientes con anemia aplásica y en pacientes con cáncer con supresión transitoria inducida por quimioterapia de la hematopoyesis, los niveles en suero del ligando flt-3 fluctúan en una relación inversa al grado de fallo de la médula ósea. Los niveles de ligando flt-3 en suero se correlacionan inversamente con la capacidad formadora de colonias *in vitro* de precursores de médula ósea de pacientes con anemia aplásica. Se ha mostrado que el tratamiento con ligando flt-3 de ratones expuestos a células de fibrosarcoma singeneicas produce la completa regresión tumoral y tasas de crecimiento tumoral reducidas.

Las citocinas antitumorales pueden ser útiles en los procedimientos y composiciones. Una "citocina antitumoral" es una citocina que puede limitar el crecimiento o metástasis de células tumorales *in vitro* o *in vivo*, o puede prolongar la supervivencia de un animal que lleva tumor, cuando tanto se mezcla con las células como se administra al animal. La citocina puede formularse como una disolución en un tampón biológicamente compatible, por ejemplo, PBS, y mezclarse con células tumorales *in vitro*. La concentración de citocina puede ser de aproximadamente el intervalo picomolar a aproximadamente el intervalo micromolar. Una citocina antitumoral reducirá, por ejemplo, la tasa de crecimiento de las células, por ejemplo, al menos el 10% en comparación con tampón solo, o inhibirá las propiedades metastásicas de las células, como puede evidenciarse, por ejemplo, por elevada adhesividad celular o disminuida capacidad para invadir un sustrato de matriz extracelular, tal como una membrana basal artificial. Alternativamente, una citocina antitumoral puede inhibir el crecimiento o metástasis de un tumor *in vivo*, o puede prolongar la supervivencia de un animal que lleva tumor. Para evaluar los efectos antitumorales *in vivo* de una citocina, la citocina puede formularse en un vehículo farmacéuticamente aceptable y administrarse, por ejemplo, por inyección intravenosa, intratumoral o intraperitoneal. La citocina también puede administrarse en asociación con células, tales como células tumorales que expresan o están recubiertas con la citocina.

Ensayos para bioactividad

Según la invención, se prefiere que una citocina sea "bioactiva", "altamente bioactiva", "extremadamente bioactiva", "nativamente bioactiva" o "suprabioactiva". Los diferentes niveles de bioactividad se refieren a la capacidad para inducir un cambio en un leucocito (distinto de la mera ocupación de los receptores de leucocitos para la citocina). Según la invención, todas las citocinas que se producen naturalmente son nativamente bioactivas. Muchos tipos de ensayo pueden demostrar la bioactividad de una citocina que no se produce naturalmente. Por ejemplo, puede mostrarse que una citocina induce supervivencia y/o proliferación de un tipo de célula particular. Como otro ejemplo,

una citocina puede cambiar la concentración de un segundo mensajero intracelular, tal como AMPc, ácido araquidónico, iones calcio o trifosfato de inositol. Lo siguiente son ejemplos de ensayos para bioactividad:

Ensayo 1

5 Cada pocillo de una o más bandejas de microtítulo Lux de 60 pocillos se carga con 200 células FDC-P1 en 10 ul de medio Eagle modificado por Dulbecco con una concentración final de 10% de suero de ternero recién nacido. La citocina en una concentración de en casi el intervalo micromolar se añade a cada pocillo en un volumen de 5 ul. La bandeja se incuba durante 48 h a 37 °C en 10% de CO₂. Se realizan recuentos de células viables. Se cuenta el número promedio de células viables/pocillo. Este ensayo es útil, por ejemplo, para identificar bioactividad mediada por un receptor de GM-CSF murino.

10 Ensayo 2

Muestra de citocinas y un patrón recombinante idéntico a una citocina que se produce naturalmente se diluyen cada uno sucesivamente en RPMI-10 completo en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Cada dilución se siembra por triplicado. Las células CT.4S en crecimiento de fase logarítmica activa se recogen, se lavan al menos dos veces en RPMI-10 completo y se resuspenden en RPMI-10 completo a 1×10^5 células/ml. 15 50 ul de la suspensión de células se añaden a cada pocillo de la placa, que luego se incuba durante 24 h a 37 °C en 5% de CO₂. Se añade timidina tritiada a cada pocillo y la placa se incuba durante 24 h adicionales. Las células se recogen luego y la incorporación de tritio se mide por recuento de centelleo líquido. Este ensayo es útil, por ejemplo, para identificar bioactividad mediada por un receptor de IL-4.

Ensayo 3 (Ensayo de formación de colonias)

20 Se funde agar (4% en peso/volumen) en agua estéril hirviendo 3 min. Entonces, el agar se enfría a 42 °C y se añade a 42 °C a RPMI-15 a una concentración final del 0,4%. La disolución se mantiene a 42 °C. Se extraen los fémures de ratones jóvenes usando técnica estéril. Se recoge médula ósea lavando los extremos abiertos de los huesos con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) estéril usando una jeringuilla equipada con una aguja 23G. La médula ósea se coloca en un tubo de cultivo de tejido de 15 ml y se agita con vórtex en una suspensión de células. Los 25 fragmentos de hueso se dejan depositar durante 5 min, y la suspensión de sobrenadante se retira. La suspensión se ajusta a $7,5 \times 10^6$ células nucleadas/ml y se diluye a 1:100 añadiendo RPMI a 42 °C con 0,4% de agar. Se añaden diluciones sucesivas dobles de citocina a placas de cultivo de tejido de 35 mm en un volumen $\leq 0,2$ ml. Las placas de control no tienen citocina añadida. Se añade 1 ml de suspensión de células caliente a cada placa y el agar se deja fraguar a temperatura ambiente. Los cultivos se incuban durante 5-7 días a 37 °C en 5% de CO₂. Entonces, la 30 formación de colonias se evalúa por microscopía. Se cuenta el número promedio de colonias de un tipo dado (o número agregado de colonias de diferentes tipos dados) sobre las placas de citocinas y el número promedio sobre las placas de control. Este ensayo es útil, por ejemplo, para identificar bioactividad mediada por receptores de CSF.

Ensayo 4

35 Se diluye citocina sucesivamente en RPMI 1640/HEPES 25 mM/1% de BSA. Se siembran 25 ul de cada dilución por triplicado en un fondo de cámara de quimiotaxia de múltiples pocillos. Los pocillos que contienen medio solo sirven de controles negativos y los pocillos que contienen citocina que se produce naturalmente que induce quimiotaxia sirven de controles positivos. Una membrana de policarbonato se coloca sobre el fondo de la cámara y la cámara se ensambla. Se añaden 50 ul de células mononucleares de sangre periférica a $1,5 \times 10^6$ células/ml en RPMI/HEPES/BSA a cada uno de los pocillos superiores de la cámara. La cámara se incuba durante 90 min a 37 °C 40 en 5% de CO₂. La membrana se quita, se lava y se tiñe. Las células migradas en 3-5 campos al azar de cada pocillo se cuentan por microscopía.

Ensayo 5

45 El patrón de referencia de citocinas que se produce naturalmente se diluye a 2 ng/ml en un tubo de 17 x 100 mm usando medio complementado. También se preparan 3 diluciones sucesivas quintuplas más. Las diluciones sucesivas de citocina se preparan en tubos de 17 x 100 mm de 2 ng/ml a 20 pg/ml. Se añaden 50 ul de linfoblastos humanos activados por PHA a 4×10^5 células/ml en medio suplementario a cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. 50 ul de cada patrón de dilución de referencia o citocina se añaden a pocillos triplicados. Los pocillos de control negativo reciben 50 ul de medio complementado solo. La placa se incuba durante 48 h a 37 °C en 5% de CO₂ y las células se marcan con timidina tritiada. La incorporación se mide por 50 recuento de centelleo líquido. Este ensayo es útil, por ejemplo, para identificar bioactividad mediada por un receptor de IL-12.

Ensayo 6

55 En otro ensayo para bioactividad, un animal inmunocompetente se vacuna con en el orden de 10^4 - 10^8 células tumorales transducidas con citocina irradiada o recubiertas de citocina, y se exponen con en el orden de 10^4 - 10^8 células tumorales no mutantes vivas (en cualquier secuencia temporal). Las lecturas del ensayo son supervivencia, aparición de tumor o número de metástasis.

Otros ejemplos de ensayos de citocinas pueden encontrarse, por ejemplo, en: Callard RE y col., Assay for human B cell growth and differentiation factors. En: Clemens MJ y col., (eds) Lymphokines and Interferons. A practical Approach, pág. 345-64, IRL Press, Oxford 1987; Coligan JE y col., Current protocols in immunology. Grene and Wiley-Interscience, Nueva York 1991); Dotsika EN Assays for mediators affecting cellular immune functions. Current Opinion in Immunology 2: 932-5 (1989); Feldmann M y col., Cytokine assays: role in evaluation of the pathogenesis of autoimmunity. Immunological Reviews 119: 105-123 (1991); Guiguet M y col., Misinterpretation of the biological activity of cytokine-containing preparations attributable to unrecognized interacting components. Analytical Biochemistry 247(2): 441-442 (1997); Hamblin AS & O'Garra A Assays for interleukins and other related factors. En: Lymphocytes, a practical approach, Klaus GGB (edt), pp. 209-28, IRL Press, Oxford, (1987); Laska EM & Meisner MJ Statistical methods and applications of bioassay. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 27: 385-97 (1987); Mosman TR & Fong TAT Specific assays for cytokine production by T cells Journal of Immunological Methods 116: 151-8 (1989); Newton RC & Uhl J Assays relevant to the detection and quantitation of cytokines and their inhibitors. Modern Methods in Pharmacol. 5: 83-99 (1989); Thorpe R y col., Detection and measurement of cytokines. Blood Rev. 6: 133-48 (1992); van Zoelen EJ The use, of biological assays for detection of polypeptide growth factors. Progress in Growth Factor Research 2: 131-52 (1990); Winstanley FP Cytokine bioassay. En: Gallagher G y col., (eds) Tumor Immunobiology, A practical Approach. Oxford University Press, pág. 179-303 (1993); Wadha M y col., Quantitative biological assays for individual cytokines. En: Balkwill FR (edt) Cytokines, A practical approach. Oxford University press, pág. 309-330 (1991).

Según la invención, si una citocina que no se produce naturalmente da una lectura en un ensayo de bioactividad que es al menos el 10%, pero no superior al 29% (al 1% más próximo) de la lectura dada por una cantidad equimolar de una citocina que se produce naturalmente (dando lo último un resultado positivo en el ensayo), entonces la citocina que no se produce naturalmente es "bioactiva". Según la invención, si una citocina que no se produce naturalmente da una lectura en un ensayo de bioactividad que es al menos el 30%, pero no superior al 49% (al 1% más próximo) de la lectura dada por una cantidad equimolar de una citocina que se produce naturalmente (dando lo último un resultado positivo en el ensayo), entonces la citocina que no se produce naturalmente es "altamente bioactiva". Según la invención, si una citocina que no se produce naturalmente da una lectura en un ensayo de bioactividad que es al menos el 50%, pero no superior al 69% (al 1% más próximo) de la lectura dada por una cantidad equimolar de una citocina que se produce naturalmente (dando lo último un resultado positivo en el ensayo), entonces la citocina que no se produce naturalmente es "extremadamente bioactiva". Según la invención, si una citocina que no se produce naturalmente da una lectura en un ensayo de bioactividad que es al menos el 70%, pero no superior al 100% (al 1% más próximo) de la lectura dada por una cantidad equimolar de una citocina que se produce naturalmente (dando lo último un resultado positivo en el ensayo), entonces la citocina que no se produce naturalmente es "nativamente bioactiva". Según la invención, si una citocina que no se produce naturalmente da una lectura en un ensayo de bioactividad que es superior al 100% de la lectura dada por una cantidad equimolar de una citocina que se produce naturalmente (dando lo último un resultado positivo en el ensayo), entonces la citocina que no se produce naturalmente es "suprabioactiva".

Ligandos para CD40

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas CD40 de diversas especies se proporcionan por, por ejemplo, el nº de acceso de Genbank Y10507, M83312 y U57745. CD40 humana es una glicoproteína transmembrana con una longitud de 277 aminoácidos (48 kDa). CD40 es una fosfoproteína y puede expresarse como un homodímero. También se ha descrito una forma soluble de CD40 (28 kDa). La proteína CD40 se expresa en todos los linfocitos B durante diversas etapas del desarrollo, linfocitos T activados y monocitos, células dendríticas foliculares, células epiteliales tímicas y diversas líneas celulares de carcinoma. Se expresa en la mayoría de los tumores malignos de linfocitos B maduros y en algunas leucemias linfocíticas agudas de linfocitos B tempranas. CD40 se ha demostrado en la mayoría de las líneas de células de mieloma y células de mieloma de pacientes con discrasia de células plasmáticas.

La inducción de ARNm de CD40 y la mejora de la expresión de proteínas de la superficie celular en monocitos humanos primarios se observa después del tratamiento con GM-CSF, IL3 o IFN-gamma. El gen CD40 humano está mapeado en el cromosoma 20.

Se ha propuesto que CD40 desempeña una función en el desarrollo de células de memoria. También desempeña una función en la activación celular, que sirve de factor de competencia y factor de progresión. La reticulación del antígeno CD40 (en combinación con citocinas tales como IL4 e IL5) conduce a proliferación de linfocitos B e induce conmutación de clase de inmunoglobulina de IgM a la síntesis de IgG, IgA e IgE en ausencia de linfocitos T activados. CD40 es una de las señales obligatorias requerida para el compromiso de linfocitos B sin tratamiento previo a la secreción con la secreción de IgA; el mecanismo de inducción de IgA requiere la cooperación de IL10 y TGF-beta. CD40 soluble inhibe la proliferación de linfocitos B dependiente de linfocitos T.

Anticuerpos monoclonales contra CD40 median en una variedad de efectos sobre linfocitos B, que incluye inducción de adhesión intercelular (mediante CD11a/CD18 (LFA-1)), proliferación a corto y largo plazo, diferenciación y fosforilación potenciada de proteínas tirosina. Se previene que los centrocitos de centros germinales experimenten muerte celular por apoptosis por activación mediante CD40 y receptores de antígeno.

En linfocitos B en reposo humanos, la expresión de CD40 se induce por IL4. El tratamiento de linfocitos B humanos con IL6 conduce a la fosforilación del dominio de CD40 intracelular. Sin embargo, CD40 no sirve de receptor para IL6. En linfocitos B humanos activados, la síntesis de IL6 se induce por tratamiento de las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD40, sugiriendo que CD40 participa en los mecanismos de transducción de señales dependientes de IL6.

Se han encontrado algunas homologías de secuencia limitadas con receptores para factor de crecimiento nervioso, TNF-alfa y CD27 y se ha asumido que CD40 también puede participar en la modulación de la actividad biológica de estas y otras citocinas.

CD40 tiene funciones biológicas también en células no inmunitarias, aunque éstas son todavía ampliamente desconocidas. Se ha mostrado que la ligación de CD40 induce muerte celular por apoptosis en células transformadas de origen mesenquimatoso y epitelial. En parte, estos procesos están mediados por el dominio de muerte presente en el dominio citoplásmico de CD40.

Un ligando particularmente útil para CD40 es CD154 ("ligando CD40"; proteína humana de 29,3 kDa, 261 aminoácidos) es un miembro de la familia TNF de proteínas. La proteína humana muestra el 82,8% y el 77,4% de identidad al nivel de ADNc y de proteínas, respectivamente, con una proteína similar aislada de células de timoma de EL4 murinas. Ambas proteínas son los ligandos para el antígeno de la superficie celular CD40 expresado sobre linfocitos B en reposo. El gen humano que codifica CD154 está mapeado en el cromosoma Xq26.3-q27. Secuencias de nucleótidos que codifican los ligandos CD40 nativos de diversas especies se proporcionan, por ejemplo, por el n° de acceso de Genbank X67878, X96710, X68550, X65453, Z48469 y L07414. Secuencias de aminoácidos de las moléculas de CD154 de diversas especies se proporcionan, por ejemplo, por los n° de acceso de la base de datos de proteínas Entrez 1705713, 231718, 560693, 3047129, 116000, 1518170, 38412, 109639, 1083014, 38484 y 37270.

CD154 se sintetiza naturalmente como un polipéptido transmembrana. Sin embargo, se ha descrito un fragmento soluble biológicamente activo de CD154 humano (Pietravalle y col., 1996, J Biol Chem 271:5965-5967). Mazzei y col., (1995, J Biol Chem 270:7025-7028) identificaron un fragmento soluble biológicamente activo de CD154 como un homotrímero de polipéptidos que consiste en los aminoácidos Glu 108 a Leu 261 de CD154 transmembrana intacto. Graf y col. (1995, Eur J Immunol 25:1749) describen otro fragmento activo que consiste en el fragmento del extremo C producido por escisión proteolítica en Met 113. Aruffo y col. divulgan formas solubles de CD154 y su uso para estimular linfocitos B *in vitro* en la patente de EE.UU. 5.540.926. En la presente invención, ligandos particularmente útiles para CD40 incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia como se expone en SEC ID N°. 2 de la patente 926 de los residuos de aminoácidos 47 a 261. Estos residuos comprenden el dominio extracelular de CD154 humano.

Otro tipo de ligando particularmente útil para CD40 es un anticuerpo para CD40. Ejemplos de tales anticuerpos incluyen los anticuerpos monoclonales designados con los números de producto MCA1143 y MCA1590 de Harlan Bioproducts for Science (Indianápolis, IN); anticuerpos monoclonales designados con los números de catálogo P61640F (producido por el clon 14G7), P42374M (producido por el clon MAB89), P61046M (producido por el clon BL-C4) y P54486M (producido por el clon B-B20) de Biodesign International (Kennebunk, ME); anticuerpo monoclonal designado con el número de catálogo 05-422 (producido por el clon 626.1) de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); anticuerpo monoclonal designado con el número de catálogo 3601 (producido por el clon S2C6) de Mabtech (Nacka, Suecia); anticuerpos monoclonales designados con el número de catálogo RDI-CBL486 (producido por el clon BB20), RDI-M1691 clb (producido por el clon CLB-14G7), RDI-mCD40-323 (producido por el clon 3/23) de Research Diagnostics (Flanders, NJ); anticuerpos monoclonales descritos en Schwabe y col., 1997, Hybridoma 16:217-226; anticuerpos monoclonales descritos en Bjorck y col., 1994, Immunology 83:430-437; anticuerpo monoclonal G28-5 descrito por Ledbetter y col., 1994, Circ Shock 44:67-72; y anticuerpos monoclonales descritos en Buske y col., 1997, Exp Hematol 25:329-337.

Opsoninas

Como se define anteriormente en este documento, "opsonina" se refiere a moléculas que se producen naturalmente y que no se producen naturalmente que se unen a tanto antígenos como células presentadoras de antígeno (APC) tales como, por ejemplo, leucocitos fagocíticos (incluyendo monocitos y macrófagos), células dendríticas (por ejemplo, células de Langerhans de la piel), linfocitos B y, en seres humanos, células endoteliales, o moléculas que pueden procesarse de forma que al menos un producto de la etapa o etapas de procesamiento pueda unirse a tanto antígenos como células presentadoras de antígeno (APC) tal como, por ejemplo, leucocitos fagocíticos, células dendríticas, linfocitos B y, en seres humanos, células endoteliales.

Sin quedar ligado a un mecanismo de acción cualquiera, se cree que la célula potenciada por opsoninas proporciona un efecto beneficioso según la invención debido a que la porción de opsonina actúa de enlace o agente de acoplamiento entre el antígeno y la APC para permitir unión más eficaz, engullición e internalización del antígeno. Además, la propia opsonina puede internalizarse con el antígeno. "Internalización" se refiere a la captación celular de una molécula de forma que entre en el citoplasma o un compartimento dentro del citoplasma de la célula. La fagocitosis es un proceso por el que una molécula es internalizada por una célula.

Opsoninas preferidas son opsoninas de no roedor, por ejemplo, opsoninas de primate, por ejemplo, humanas. Opsoninas útiles según la invención se unen a receptores sobre APC (por ejemplo, leucocitos fagocíticos, por ejemplo, macrófagos y otras células del sistema fagocítico) tales como receptores sobre células que desempeñan una función en inmunidad innata, como se describe en la presente memoria.

5 Algunos conjuntos de opsoninas pueden considerarse estructuralmente y funcionalmente similares. Por ejemplo, una familia comprende fragmentos de componentes del complemento C3 y C4. Estos dos componentes son altamente estructuralmente homólogos, y cada uno posee un enlace tioléster intramolecular que se rompe cuando un péptido (C3a o C4a respectivamente) se escinde proteolíticamente de la molécula nativa. La rotura del tioléster provee de una estructura química que puede formar un éster enlace con un antígeno. El resto de C3 sobre el que están los
10 residuos del enlace éster, es decir, el resto de no C3a, se designa C3b, y C4b es el producto análogo de escisión de C4. C3b puede proteolizarse adicionalmente por proteínas tales como factor I para dar fragmentos tales como C3bi y C3d, que también permanecen unidas al antígeno mediante el enlace éster.

Hay cuatro proteínas estructuralmente únicas que son conocidas por servir de receptores de alta afinidad para los fragmentos unidos a membrana biológicamente activos de C3 y/o C4. CR1 es el principal receptor para el fragmento
15 C3b de C3 y el fragmento C4b de C4. Se expresa en monocitos y APC derivadas de monocitos, entre otros tipos de células. CR2 es el principal receptor para el fragmento de C3 conocido como C3d, y se expresa en, por ejemplo, linfocitos B maduros, pero no en células de linaje monocítico. Se cree que la principal función de CR2 en linfocitos B es la coestimulación directa de linfocitos B sincronizada con sus antígenos relacionados.

CR3 se expresa principalmente por neutrófilos y monocitos y también se expresa en FDC, células de Kupffer y
20 células NK. CR3 es un receptor del fragmento C3 con una especificidad primaria por C3bi. CR3 se ha propuesto como un importante organizador de eventos citoesqueléticos necesarios para interacciones adhesivas y reorganización de la membrana durante procesos tales como la fagocitosis.

CR4 es un miembro de la familia de integrina beta2, y su cadena alfa es estructuralmente similar a la cadena alfa de
25 CR3 y LFA-1. Se cree que sus ligandos fisiológicos primarios son C3d y C3d,g; sin embargo, sus actividades biológicas son menos bien entendidas que CR3.

Otro ejemplo de una familia de opsoninas innatas es las colectinas, un grupo de lectinas de tipo C colagenosas que comprende el componente del complemento C1q, proteína de unión a manosa, proteínas tensioactivas A y D, y
30 conglutinina. Cada molécula comprende un dominio de lectina que puede unirse a un antígeno, y un dominio colagenoso que puede unirse a receptores sobre células mononucleares fagocíticas, que incluyen receptores que son completamente o parcialmente idénticos al receptor de C1q (Nepomuceno y col., *Immunity* 6:11 '9-29; Tenner y col., *Immunity* 3:485-93; Guan y col., *J Immunol* 152:4005-16; Geertsma y col., *Am J Physiol* 267:L578-84; Miyamura y col., *Biochem J* 300:237-42; Malhotra y col., *J Exp Med* 172:955-9; Malhotra y col., *Biochem J* 293:15-19). La mayoría de las colectinas conocidas comprenden múltiples cadenas de polipéptidos, en algunos casos homómeras y en otros heterómeras, que se ensamblan postraduccionalmente, en parte por enlace reticulado covalente de
35 residuos de hidroxiprolina e hidroxilisina. Se demuestra que las colectinas son opsoninas en, por ejemplo, Pikaar y col., *J Infect Dis* 172:481-9; Alvarez-Dominguez y col., *Infection & Immunity* 61:3664-72; Kuhlman y col., *J Exp Med* 169:1733-45; y Geertsma y col., obra citada.

Entre las otras opsoninas innatas útiles según la invención están la proteína C reactiva (CRP), alfa-2 macroglobulina y fibronectina. CRP, un miembro de la familia de pentraxina de moléculas, se une a receptores sobre células de
40 linaje monocítico y se ha mostrado que es una opsonina (Tebo y Mortenson, *J Immunol* 144:231-8; Holzer y col., *J Immunol* 133:1424-30). La alfa-2 macroglobulina, como C3 y C4, comprende un enlace tioléster interno que puede romperse cuando la molécula se proteoliza. Tal rotura permite la unión covalente de la molécula a un antígeno, y la unión de alfa-2 macroglobulina a una APC puede promover la captación del conjugado. La fibronectina se une a la integrina alfa 5 beta 1 y también puede unirse a diversos antígenos, permitiendo que sirva de opsonina (Cosio, *J Lab Clin Med* 103:613-9; Czop y Austen, *J Immunol* 129:2678-81).
45

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) pueden servir de opsoninas uniendo antígenos mediante sus regiones variables y APC mediante sus regiones constantes. Normalmente, una inmunoglobulina comprende dos cadenas pesadas que están covalentemente unidas entre sí y cada una de las cuales está unida a una cadena ligera. Estos heterotetrámeros pueden reunirse adicionalmente en estructuras de mayor orden, tales como los pentámeros de
50 IgM. Tanto las regiones variables de cadena pesada como ligera pueden contribuir a la estructura del sitio de unión a antígeno, mientras que el sitio de unión a APC se localiza sobre la región constante de la cadena pesada. También se han descrito anticuerpos monocatenarios recombinantes. Los receptores de APC para inmunoglobulinas incluyen receptores de Fc alfa, Fc gamma, Fc epsilon y Fc mu para IgA, IgG, IgE e IgM, respectivamente.

Se secretan opsoninas que se expresan naturalmente por organismos eucariotas multicelulares. La última característica distingue opsoninas de moléculas de adhesión. Una molécula que no se produce naturalmente que
55 contiene un resto de unión a APC que se produce naturalmente debe considerarse una opsonina si contiene un resto mediante el que puede unirse o asociarse establemente a una célula de forma que el resto de unión a APC se localice en el espacio extracelular, tanto si la molécula contiene como si no un resto de unión a antígeno de un antígeno que se produce naturalmente. Los restos mediante los que las moléculas pueden unirse establemente a

una célula incluyen restos de reticulación, secuencias transmembrana y restos de lípidos. La preparación de proteínas que contienen estas secuencias o restos es muy conocida para un experto en la materia.

5 Un "resto de unión a APC de una opsonina" es una secuencia o dominio de una opsonina que cuando se incluye en una molécula quimérica permite la unión de la molécula quimérica a un receptor que se expresa fisiológicamente en una APC con una afinidad al menos en el intervalo nanomolar.

10 Hay varios ejemplos de fragmentos de opsonina que comprenden restos de unión a APC. Un fragmento tal puede ser de cualquier longitud mientras que retenga una función de unión a APC; por ejemplo, puede tener aproximadamente 40 aminoácidos, 100 aminoácidos, 150 aminoácidos, 500 aminoácidos, 800 aminoácidos, o incluso tan largos como 3000 aminoácidos. Por ejemplo, Las Holtet y col., 1994, FEBS Lett 344:242 describen un fragmento del extremo carboxi de a2m humano (val1299-ala1451) que se une con alta afinidad al receptor de a2m. Los fragmentos que comprenden los aminoácidos 1314-1451 de a2m humano y el dominio de rata correspondiente a2m también se unen a receptores de a2m, no obstante con 1-2% de las afinidades de a2m nativo (Van Leuven y col., 1986, J Biol Chem 261:11369; Enghild y col., 1989, Biochemistry 28:1406; Salvesen y col., 1992, FEBS Lett 313:198; Sottrup-Jensen y col., 1986, FEBS Lett 205:20).

15 Becherer y Lambris, 1988, J Biol Chem 263:14586, describen fragmentos de C3b que se unen a CR1, por ejemplo, C3c, fragmentos de C3 generados por tratamiento con elastasa y que comprenden el extremo N de la cadena alfa de C3b, y un péptido sintético que comprende los 42 aminoácidos del extremo N de la cadena alfa de C3b. También se ha descrito una secuencia de unión en C3 para CR3 (Wright y col., 1987, PNAS 84:4235).

20 "Tallos de colágeno" de C1q, que son fragmentos del extremo N obtenidos por digestión con pepsina, se unen al receptor de C1q (Reid, 1981, Methods Enzymol 80:16; Malhotra y col., 1993, Biochem J 293:15). Malhotra y col., arriba, también proporcionan pruebas de que un resto de unión a APC de congulinina comprende sus 55 aminoácidos del extremo N. Ezekowitz (patente de EE.UU. 5.270.199) ofrece un sitio de unión a APC putativo en proteína de unión a manosa humana que consiste en los nucleótidos 370-438 de la Fig. 2 en la patente 199. Además, por homología con congulinina, el exón I divulgado en la patente 199 puede comprender un resto de unión a APC.

25 Un resto de unión a APC de IgG comprende el dominio CH2 y la región bisagra inferior, que incluye los residuos 234-237, como se describe por Canfield y Morrison, 1991, J Exp Med 173:1483-91; Lund y col., 1991, J Immunol 147:2657-62; y Sarmay y col., 1992, Mol Immunol, 29:633-9.

30 Ejemplos de opsoninas que pueden usarse en las composiciones y procedimientos incluyen fibronectina (por ejemplo, accesos de Genbank X02761, K00799, K02273, X82402, X00307, X00739), CRP (por ejemplo, accesos de Genbank X17496, M11880, M11881, M11882), componentes del complemento tales como C1q (por ejemplo, accesos de Genbank X66295, M22531, X03084, X58861, y accesos de Swiss-Prot P02747, P02745), fragmentos del complemento tales como C3b y C3d (por ejemplo, accesos de Genbank K02782, K02765), proteína de unión a manosa (por ejemplo, accesos de Genbank S42292, S42294, X15422), congulinina (por ejemplo, acceso de Genbank X71774), alfa-2-macroglobulina (por ejemplo, accesos de Genbank M93264, M11313), y proteínas tensioactivas A (por ejemplo, accesos de Genbank M68519, S48768) y D (por ejemplo, accesos de Genbank L40156, X65018, S38981), inmunoglobulinas, y sus homólogos entre especies.

Tabla 2

Opsonina a modo de ejemplo, pares de resto de unión a APC/receptor de APC útiles según la invención.

Opsonina	Resto de unión a APC a modo de ejemplo	Receptor
α -2 macroglobulina	Val(1299)-Ala(1451) de α -2m humano	receptor de α -2m, CD91
C3b	42 aminoácidos del extremo N de la cadena a' de C3b humano	CR1
C3bi	C3bi	CR2, CR3
C3d	C3d	CR2, CR4
C1q	Tallos de colágeno (Reid, 1981, Methods Enzymol. 80:16)	Receptor de colectina (Nepomuceno y col., 1997, CD93)
Congulinina	55 aminoácidos del extremo N de congulinina bovina	Receptor de colectina
MBP	1. Polipéptido codificado por nt 370-438 de la Fig. 2, patente de EE.UU. 5.270.199	Receptor de colectina, CD35, CD14

Opsonina	Resto de unión a APC a modo de ejemplo	Receptor
	2. Polipéptido codificado por Econ..... I de la Fig. 2, patente de EE.UU. 5.270.199	
CRP	CRP	Receptor de CRP, Fc γ RI, Fc γ RIIa (CD32)
Fibronectina	Fibronectina	integrina α 5b1
IgG	Dominio CH2 más bisagra inferior que incluye los aminoácidos 234-237, como se describe por Lund y col., 1991, J. Immunol. 147:2657	Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII
Proteína tensioactiva A Proteína tensioactiva D	Proteína tensioactiva A Proteína tensioactiva D	Receptor de colectina, CD14

Determinación de opsonicidad según la invención

Una opsonina dada que se produce naturalmente se considera útil según la invención si se determina que posee opsonicidad según uno o más de los siguientes ensayos, y si es una molécula secretada.

Ensayo 1

- 5 En un ensayo de opsonicidad, como se describe por O'Rear y Ross en Current Protocols in Immunology, 1994, John Wiley & Sons, pág. 13.4.5-9, se obtienen SRBC unidas mediante un enlace que se produce fisiológicamente a la molécula de opsonina candidata. APC de las especies para las que la opsonina candidata es nativa se suspenden a 4×10^6 /ml en HBSS frío en hielo con 1% (peso/volumen) de fracción de Cohn de BSA. Si la opsonina candidata es un fragmento de C3, las APC son monocitos de sangre periférica sin cultivar recientemente extraídos. SRBC ligadas a la opsonina candidata o SRBC de control (idénticas a las anteriores, pero no ligadas a la opsonina candidata) se suspenden en la misma disolución a 2×10^8 /ml. 100 μ l de suspensión de SRBC y 100 μ l de suspensión de APC se mezclan en un tubo de plástico de 10 x 75 mm. El tubo se gira a 40 rpm a 37 °C durante 2 - 20 min. Una pequeña gota de la suspensión se dispone sobre un portaobjetos, se cubre con un cubreobjetos y se deja reposar durante 5-10 min. El exceso de fluido puede eliminarse por presión sobre el cubreobjetos, y el cubreobjetos puede sellarse al portaobjetos, por ejemplo, con esmalte de uñas transparente. El portaobjetos se examina microscópicamente, y se determina el porcentaje de APC visiblemente adherentes para 4 o más SRBC. Si el porcentaje es del 50% o superior cuando hay hasta 4×10^4 moléculas de opsonina candidatas/SRBC, la opsonina candidata puede ser una opsonina.

Ensayo 2 (Para opsonina candidata activada por proteasa)

- 20 Opsonina candidata u opsonina candidata radiomarcada se trata con un exceso molar de 1,5-3 veces de proteasa (trietanolamina 0,05 M-NaCl 0,1 M, pH 8,0, temperatura ambiente durante la noche). En este ensayo, la proteasa puede servir de antígeno o puede añadirse un exceso de otro antígeno. Antes de los estudios de unión, el complejo de opsonina candidata-antígeno se dializa contra HBSS (4 °C).

- 25 El complejo de opsonina candidata-antígeno que se une a monocitos se mide incubando ligando marcado a una concentración hasta 1,0 M con $(1,5-4,0) \times 10^6$ monocitos en 200 ml de volumen sobre hielo. La unión no específica de ligandos radiomarcados se determina en presencia de un exceso molar de 100 veces del complejo marcado de opsonina candidata-antígeno. El ligando sin unir se separa de las células y el ligando unido a células por rápida filtración a vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Los estudios se realizan sobre hielo para prevenir posibles complicaciones debido a endocitosis. Las constantes de unión y el número de sitios por célula se determinan por análisis y por ajuste a curva no lineal. Si la afinidad del complejo de opsonina candidata-antígeno por un sitio de unión a monocito está en al menos el intervalo nanomolar, la opsonina candidata es una opsonina.

Ensayo 3

Parte I

- 35 Para evaluar directamente si la opsonina candidata está unida o no a la superficie de *P. carinii* se realiza microscopía inmunoelectrónica. Se aíslan *P. carinii* de lavado broncoalveolar (BAL) de ratas infectadas moribundas usando TBS con calcio 1 mM para preservar la opsonina candidata unida a superficie. Organismos aislados se fijan en tampón peryodato-lisina-paraformaldehído y se incorporan en medio de montaje Lowacryl (Ted Pella, Inc., Redding, CA). Se obtienen secciones ultrafinas, se bloquean con suero de cabra normal (2%) durante 1 h y se incuban con tanto IgG de conejo anti-opsonina candidata como de conejo no inmune (25 mg/ml) durante la noche. Después de lavar, las secciones se incuban posteriormente con IgG de cabra y de conejo conjugada con oro coloidal

15 nM (Amersham Corp., Arlington Heights, IL). Las secciones se lavan de nuevo y se examinan sobre un microscopio electrónico de transmisión (modelo 6400:JEOL USA, Inc., Peabody, MA).

Parte II

5 La unión de *P. carinii* a macrófagos alveolares cultivados en presencia o ausencia de anticuerpo para la opsonina candidata o con la adición de candidato purificado se cuantifica del siguiente modo. La adherencia de *P. carinii* a macrófagos alveolares se ensaya marcando con ^{51}Cr los organismos. Se aíslan *P. carinii* de ratas infectadas con TBS que contiene calcio 1 mM para prevenir la pérdida de opsonina candidata unida a superficie. Los organismos se radiomarcán por incubación durante 8 h a 37 °C en 2 ml de DME que contiene 20% de SBF y 200 mCi de ^{51}Cr -cromato de sodio (New England Nuclear). Se lavan macrófagos alveolares normales de ratas sanas y se siembran en placas de cultivo de tejido (1×10^5 células/pocillo) que se han recubierto previamente con IgG de rata normal (100 mg/ml X 60 min) con el fin de garantizar la adherencia de la película de los macrófagos. Después de 1 h, los macrófagos se lavan suavemente con HBSS para eliminar células no adherentes. > 95% de los macrófagos son adherentes después de este lavado. ^{51}Cr -*P. carinii* (1×10^6) que contiene opsonina candidata asociada a superficie se añade a los macrófagos y se incuban a 37 °C durante una hora adicional. Posteriormente, *P. carinii* no adherente se elimina lavando. Las monocapas de macrófago que contienen *P. carinii* adherente se solubilizan en NaOH 1 N y se cuantifican. La adherencia de *P. carinii* se define como: porcentaje de adherencia = $(A/A + B) \times 100$ en la que A = ^{51}Cr -*P. carinii* asociada a la monocapa, y B = ^{51}Cr -*P. carinii* sin asociar. Para evaluar el efecto de la opsonina candidata sobre la unión de *P. carinii* a células pulmonares de macrófago alveolar en cultivo se realizan ensayos de adherencia de *P. carinii* en presencia o ausencia de un anticuerpo de conejo policlonal generado contra la opsonina candidata (100 mg/ml).

Si la opsonina candidata se une a *P. carinii* es evidente en la Parte I y si, en la Parte II, el % de adherencia disminuye en presencia de anti-opsonina candidata con significancia estadística de $P < 0,05$, la opsonina candidata es una opsonina.

Ensayo 4

25 La asociación de bacterias con monocitos adherentes se mide del siguiente modo. El nivel de endotoxina en PBS modificado y en todos los tampones usados es inferior a 50 pg/ml como se ha determinado por el ensayo de Limulus. 5×10^3 monocitos en PBS modificado se dejan adherirse a los pocillos de una placa de Terasaki durante 2 h a 37 °C. Después de eliminar las células no adherentes durante tres lavados, con PBS, se añaden 5×10^4 bacterias marcadas con FITC en 0,5 ml de tampón con o sin 10-50 microgramos/ml de opsonina candidata. Se usa una relación de bacterias con respecto a monocitos de 10:1 a 50:1. Después de 30 min de incubación a 37 °C en la oscuridad, las bacterias no adherentes se eliminan por cinco lavados con PBS caliente. Los ensayos se realizan por cuadruplicado; en cada pocillo, el número de bacterias asociadas a 3 100 monocitos se cuenta bajo un microscopio de fluorescencia usando un aumento x 400. Los resultados se expresan como el número de bacterias asociadas a 100 monocitos. Si este número con opsonina candidata puede ser al menos dos veces el de sin opsonina candidata, la opsonina candidata es una opsonina.

Ensayo 5

Parte I

40 Aproximadamente 1×10^7 a 6×10^7 bacterias por ml se incuban (20 min, 0 °C) con 10 mcg/ml de ^{125}I -opsonina candidata en un volumen total de 0,7 ml. de alícuotas de PBS, 100 ml, de las mezclas de reacción se estratifican sobre 150 ml de un cojín de aceite (60% de ftalato de dibutilo, 40% ftalato de dioctilo [Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.]), y las mezclas se centrifugan ($10.000 \times g$, 60 s, 4 °C). La punta del tubo, que contiene el sedimento de células, se corta con una cuchilla de afeitar Mozart, y se cuenta la radiactividad.

Parte II

45 Se siembran APC en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Costar, Cambridge, Mass.) a 2×10^5 células por ml la tarde antes de uso. Se añaden 2×10^6 bacterias por pocillo (0,1 ml por pocillo) a las placas de cultivo con o sin 100 mcg/ml de opsonina candidata. Las placas se centrifugan entonces a $1.000 \times g$ durante 7 min. Después de 15 min a 37 °C, para permitir la captación de bacterias, las bacterias libres se eliminan por varios lavados con PBS frío. Entonces se incuban (45 min, 37 °C) en RPMI 1640 más una cantidad de antibiótico que, cuando está presente en el cultivo durante 45 min, destruye todas las bacterias extracelulares. El final de este periodo de incubación se considera tiempo cero. Las monocapas se lavan tres veces con solución salina equilibrada de Hank y se añade el mismo volumen de RPMI 1640 (R0). Las células se lisan usando varios ciclos de congelación y descongelación. El número (UFC) de bacterias viables por pocillo se determina por recuentos cuantitativos de placas en placas de agar sangre (agar sangre de Columbia; Becton Dickinson, San Jose, Calif.) después de 24 h de incubación. Cada resultado se facilita como la media de tres determinaciones.

55 Si, en la Parte I, el sedimento bacteriano tratado con opsonina candidata tiene >75 KCPM y esta incorporación puede inhibirse por opsonina candidata sin marcar y si, en la Parte II, la UFC con opsonina candidata es mayor que sin ($P < 0,05$), la opsonina candidata puede ser una opsonina.

Ensayo 6

Se preparan 200 μ l de GHBSS (disolución salina equilibrada de Hank) + 0,1% de gelatina que contiene 10 mmoles de CaCl_2) que contiene 10^7 bacterias. Entonces, las bacterias se incuban a 4 °C con 20-100 μ g/ml de opsonina candidata. Los ensayos de unión se hacen en presencia o ausencia de un inhibidor competitivo. Después de la incubación durante 30 minutos, las bacterias se lavan cinco veces en GHBSS + 10 mmoles de CaCl_2 a temperatura ambiente en una microcentrifuga a 1.300 g durante 3 minutos. Después, una dilución 1:1.000 de antisuero de conejo anti-opsonina candidata se incuba con las bacterias durante 1 h en PBS + 5% de SBF y 10 mmoles de CaCl_2 , y luego las bacterias se lavan tres veces en GHBSS + 10 mmoles de CaCl_2 más 0,05% de Tween 20. La unión del antisuero a bacterias se detecta por una dilución 1:1.000 de IgG de cabra anti-conejo conjugada con rodamina (Fisher Pharmaceuticals, Orangeburg, NY). Después de la incubación, las bacterias se lavan cinco veces en GHBSS + 10 mmoles de CaCl_2 más 0,05% de Tween 20, se untan sobre portaobjetos de vidrio y se dejan secar al aire. Después las bacterias se fijan con 100% de metanol helado durante 5 minutos. Los controles negativos incluyeron la ausencia de opsonina candidata y sin anticuerpo de la primera etapa. Se examinan numerosos campos de ensayos por triplicado por microscopía de fluorescencia.

15 Parte II Asociación de bacterias radiomarcadas con células.

10^7 bacterias radiomarcadas se resuspenden en 200 μ l de GHBSS + 10 mmoles de CaCl_2 y se incuban con o sin opsonina candidata que oscila de 2 μ g/ml a 40 μ g/ml a 4 °C durante 30 min. Entonces, las bacterias se lavan tres veces en GHBSS + 10 mmoles de CaCl_2 durante 3 min a temperatura ambiente en una microcentrifuga a 1.300 g, se resuspenden en 50 μ l de GHBSS y se añaden a una suspensión de 1 ml que contiene en el orden de 10^6 APC (GHBSS). Las bacterias y APC se balancean suavemente a 37 °C durante 20 min y después las bacterias sin asociar se eliminan por cinco lavados usando centrifugación diferencial a 82 g en una microcentrifuga. Antes del último lavado, una alícuota de cada muestra se siembra sobre un portaobjetos Labtek y las células se adhieren durante 10 min, se fijan en metanol, se tiñen con Giemsa y se puntúan por microscopía óptica. Para puntuar las células sembradas sobre los portaobjetos de Labtek se cuentan al menos 400 células. El índice fagocítico representó el número de partículas asociadas o ingeridas por 100 PMN. El sedimento de antes que contiene células y bacterias radiomarcadas se lisa entonces en 100 μ l de PBS + 0,5% de Triton X-100 y la radiactividad se mide en un contador de centelleo. Si, en la Parte I, la unión específica de opsonina candidata con respecto a bacterias es evidente y, en la Parte II, la captación específica de bacterias, en cpm, es más de tres veces mayor con opsonina candidata que sin, la opsonina candidata puede ser una opsonina.

30 Ensayo 7

Parte I

Para investigar la unión a cultivos de *L. donovani*, promastigotes se siembran a 5×10^5 parásitos ml^{-1} . A momentos de tiempo regulares hasta 9 días se cuenta una fracción de parásitos, se lava y se resuspende en 1% de BSA, Ca^{2+} 0,5 mM, 0,05% de NaN_3 , solución salina tamponada con Tris (TBS) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 8,0) (diluyente) a 2×10^5 ml^{-1} . Entonces se añaden cincuenta microlitros de esta suspensión a tubos de microcentrifuga de 200 μ l que contienen 70 μ l de 5 μ g/ml de opsonina candidata radiomarcada (0,12 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) en diluyente sin EDTA, que se había extendido sobre 150 μ l de una mezcla de aceites de ftalato de dinonilo/ftalato de dibutilo (40:60 v/v). Los parásitos se incuban durante 1 h y se centrifugan mediante la fase de aceite, el sedimento de células se corta y el candidato asociado se detecta por recuento gamma. Cada ensayo se realiza por triplicado. La dependencia de la concentración del candidato que se une a promastigotes también se mide como antes, usando una actividad de 0,045 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y una serie de dilución doble de 60 a 0,015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de candidato.

Parte II

Se siembran APC a 1×10^6 células/pocillo sobre cubreobjetos de vidrio en una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos. Las células se incuban en RPMI 1640 (Life Technologies) complementado con 10% de PCS, glutamina 1 mM, 200 U/ml de penicilina y 200 μ g/ml de estreptomycin en una estufa de incubación humidificada a 37 °C. Después de 24 h se eliminan células no adherentes y las células restantes se usan después de 6 días. Los promastigotes se incuban con o sin candidato a 30 μ g/ml en RPMI 1640 durante 1 h y luego se lavan tres veces antes de añadirlos a los cultivos de APC a 10^6 /pocillo. Se deja que los promastigotes infecten APC durante 1 h, luego las células se lavan, se fijan con metanol y se tiñen con Geimsa (BDH, Poole, Dorset, RU) antes del recuento. El porcentaje de APC infectadas y el número de parásitos/100 macrófagos se determina de cultivos por cuadruplicado.

Si en la Parte I la afinidad de opsonina candidata para parásitos está al menos en el intervalo nanomolar y en la Parte II el número de parásitos capturados/100 APCs es, con opsonina candidata, al menos dos veces el de sin opsonina candidata, la opsonina candidata puede ser una opsonina.

55 Ensayo 8

Parte I

Porciones (0,5 ml) de medio de cultivo marcado con [³⁵S]-metionina que contiene 5 por ciento de suero bovino fetal y la opsonina candidata se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con 0,1 ml o 0,2 ml de una suspensión al 10 por ciento de un microorganismo). El microorganismos probado puede incluir, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las proteínas unidas son liberadas hirviendo en tampón que contiene 2 por ciento de SDS y ditiotreitól 0,1 M y se analizan sobre un 5 por ciento de gel SDS.

Parte II

Bacterias fijadas (0,1 ml; 10 por ciento en volumen; 10¹⁰ organismos por mililitro), marcadas con [³H]timidina, se incuban con 0,1 ml de suero con o sin utilización de la opsonina candidata. Después de lavarse con PBS, las bacterias se incuban en el orden de 1 x 10⁷ APC en un volumen final de 0,9 ml de PBS que contiene cationes divalentes. A intervalos se sacan 0,2 ml a PBS frío en hielo con N-etilmaleimida (2 mM) para bloquear la posterior endocitosis, y las células se lavan (a aproximadamente 100 g durante 10 segundos).

Si en la Parte I es evidente una banda correspondiente a la opsonina candidata, y si en la Parte II las CPM después de 6-10 min de incubación es al menos tres veces mayor para muestras sin agotar con suero que con suero agotado, la opsonina candidata puede ser una opsonina.

En lugar de los resultados de las Partes I de los ensayos 3, 5, 6, 7, 8, una opsonina candidata que satisface la Parte II de un ensayo puede ser una opsonina si puede unirse al antígeno del ensayo con una afinidad en al menos el intervalo nanomolar.

Ensayo 9

SRBC recubiertas con al menos 1,2 x 10⁴ moléculas/célula de un fragmento de C3 se preparan como se describe por O'Rear y Ross en Current Protocols in Immunology, 1994, John Wiley & Sons, pág. 13.4.5-9. 250 ul de monocitos a 2 x 10⁵ células/ml de RPMI con 10% suero bovino fetal se añaden a cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de vidrio de 8 pocillos y se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ durante 3 h. Los monocitos se lavan dos veces con HBSS, y 50 ul de las SRBC a 1,5 x 10⁸/ml de DVBS²⁺ se añaden a cada pocillo. La placa se centrifuga a 50 g durante 5 min y luego se incuba a 37 °C, 5% de CO₂ durante 3 h. Las paredes se lavan dos veces con HBSS, se fijan con 0,5% de glutaraldehído y se tiñen con tinción Giemsa. Si >40% de los monocitos forman rosetas con al menos 1 SRBC como se ha determinado por microscopía óptica, el candidato puede ser una opsonina.

Proteínas de choque térmico útiles en la invención

Las proteínas de choque térmico (HSP) se asocian en células con un amplio espectro de péptidos, polipéptidos, proteínas desnaturalizadas y antígenos con los que forman complejos. Tales complejos de HSP-péptido se han descrito como que son útiles en vacunas contra cánceres y enfermedades infecciosas por Srivastava y col., "Heat shock protein-peptide complexes in cancer immunotherapy" en Current Opinion in Immunology (1994), 6:728-732; Srivastava, "Peptide-Binding Heat Shock Proteins in the Endoplasmic Reticulum" en Advances in Cancer Research (1993), 62:153-177. Los complejos de HSP-péptido parecen funcionar de vacunas, debido a que pueden servir de moléculas portadoras y de presentación de antígeno. El desarrollo de vacunas usando tales antígenos se ha descrito por Baltz, "Vaccines in the treatment of Cancer" en Am. J Health-Syst. Pharm. (1995), 52:2574-2585. La antigenicidad de las proteínas de choque térmico parece derivarse no de la propia proteína de choque térmico, sino de los péptidos asociados, véase Udonó y col., "Heat Shock Protein 70-associated Peptides Elicit Specific Cancer Immunity" en J. Exp. Med. (1993), 178:1391-1396; Srivastava y col., "Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming" en Immunogenetics (1994), 39:93-98; Srivastava, "A Critical Contemplation on the Roles of Heat Shock Proteins in Transfer of Antigenic Peptides During Antigen Presentation" en Behring Inst. Mitt. (1994), 94:37-47. Las HSP parecen ser parte del proceso por el que los péptidos se transportan a las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) para presentación de superficie.

Se ha mostrado que varias HSP diferentes presentan inmunogenicidad, y son útiles en la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a: gp96, hsp90, hsp100, hsp60, hsp 25 y hsp70, véase Udonó y col., y Udonó y col., "Comparison of Tumor-Specific Immunogenicities of Stress-Induced Proteins gp96, hsp90, and hsp 70" en Journal of Immunology (1994), 5398-5403; gp96 y grp94, Li y col., "Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation" en The EMBO Journal, vol. 12, n° 8 (1993), 3143-3151; y gp96, hsp90 and hsp70, Blachere y col., "Heat Shock Protein Vaccines Against Cancer" en Journal Of Immunotherapy (1993), 14:352-356.

Las proteínas de choque térmico pueden purificarse para su uso en la presente invención usando un procedimiento empleando cromatografía de intercambio iónico con DE52 seguido de cromatografía de afinidad sobre ATP-agarosa, véase Welch y col., "Rapid Purification of Mammalian 70,000-Dalton Stress Proteins: Affinity of the Proteins for Nucleotides" en Molecular and Cellular Biology (junio de 1985), 1229-1237.

Moléculas de adhesión

Las moléculas de adhesión incluyen cualquier proteína de la superficie celular que participe en la mediación del

reconocimiento y adhesión de células a su sustrato y a otras células. Las moléculas de adhesión celular pueden dividirse en dos clases primarias: dependientes de Ca^{2+} (cadherinas) e independientes de Ca^{2+} .

5 Hay más de una docena de tipos diferentes de moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} llamadas cadherinas. La mayoría de las cadherinas son glicoproteínas transmembrana de paso único compuestas por aproximadamente 700-750 residuos de aminoácidos. La gran parte extracelular de la molécula está normalmente plegada en cinco dominios, cada uno de los cuales contiene aproximadamente 100 residuos de aminoácidos. Cuatro de estos dominios contienen supuestos sitios de unión a Ca^{2+} . Las cadherinas están frecuentemente presentes en la membrana celular como dímeros.

10 Las cadherinas incluyen, pero no se limitan a, cadherina E, cadherina N, cadherina BR, cadherina P, cadherina R, cadherina M, cadherina VE, cadherina T&H, cadherina OB, cadherina K, cadherina 7, cadherina 8, cadherina KSP, cadherina LI, cadherina 18, fibroblasto 1, cadherina, fibroblasto 2, cadherina, fibroblasto 3, cadherina 23, desmocolina 1, desmocolina 2, desmogleína 1, desmogleína 2, desmogleína 3 y protocadherina 1, 2, 3, 7, 8 y 9.

15 Las moléculas de adhesión restantes son independientes de Ca^{2+} y, al igual que las cadherinas, pueden usarse como ligandos de una proteína de la superficie celular sobre una APC en la presente invención. Clases generales de moléculas de adhesión, además de moléculas de adhesión específicas, se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3

Selectinas	
	L-selectina; E-selectina; P-selectina
Integrinas	
	$\alpha 1\beta 1$; $\alpha 2\beta 1$; $\alpha 3\beta 1$; $\alpha 4\beta 1$; $\alpha 5\beta 1$; $\alpha 6\beta 1$; $\alpha 7\beta 1$; $\alpha 8\beta 1$; $\alpha 9\beta 1$; $\alpha v\beta 1$; $\alpha L\beta 2$; $\alpha M\beta 2$; $\alpha X\beta 2$; $\alpha IIb\beta 3$; $\alpha v\beta 3$; $\alpha 6\beta 4$; $\alpha v\beta 5$; $\alpha v\beta 6$; $\alpha v\beta 7$; $\alpha IEL\beta 7$; $\alpha 11$
Superfamilia de inmunoglobulinas	
	Específica neurales: molécula de adhesión sobre la glía (AMOG); LICAM; glicoproteína asociada a mielina (MAG); glicoproteína de oligodendrocito-mielina (MOG); NCAM-1 (CD-56); NrCAM; OBCAM; proteína P_0 ; proteína PMP-22; neurofascina; NgCAM IgCAM sistémicos: ALCAM; basigina (CD147); BL-CAM (CD22); CD44; ICAM-1 (CD54); ICAM-3 (CD50); antígeno-2 de función de linfocitos (LFA-2); LFA-3 (CD58); moléculas de MHC; MAdCAM-1; PECAM (CD31); receptor de linfocitos T; VACM-1
Otras moléculas de adhesión	
	Agrina; CD34; GlyCAM-1; glicoproteína de oligodendrocito-mielina (OMGP)

Defensinas

20 La porción de la molécula multifuncional que es un ligando de una proteína de la superficie celular de una APC puede ser una defensina. Las defensinas son una gran familia de péptidos antimicrobianos de amplio espectro, identificados originalmente en leucocitos de conejos y seres humanos. Las defensinas, péptidos polares catiónicos (30-35 aa, 3-4 kDa), se distinguen por un tri-disulfuro conservado y principalmente estructura de hoja beta. Cuando se expresan en la superficie celular, se ha supuesto que las defensinas funcionan de barrera bioquímica contra la infección microbiana inhibiendo la colonización del epitelio por una amplia gama de microorganismos patógenos.
25 Defensinas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alfa-defensinas 1-6 humanas, péptidos 1-4 de neutrófilos humanos, beta-defensina 1 y 2 humana y beta-defensina 1 y 2 de rata.

Contrarreceptores de moléculas co-estimulantes de linfocitos T

30 La porción de la molécula multifuncional que es un ligando de una proteína de la superficie celular de una APC puede ser un contrarreceptor de una molécula co-estimulante de linfocitos T. La coestimulación se define como una ruta de señalización que aumenta más que simplemente los eventos de activación proximales del receptor de antígeno, pero que se cruza con señales específicas de antígeno sinérgicamente para permitir la activación de linfocitos. Por consiguiente, un contrarreceptor de una molécula coestimulante incluye, pero no se limita a, un receptor para uno o más de B7-1, B7-2, ICOS:B7h, PD-1:PD-L1/PD-L2, CD48, ligando CD40 y OX40. Los contrarreceptores incluyen, pero no se limitan a, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, miembros de la familia de receptores de TNF, CD40, la principal molécula coestimulante de linfocitos B, además de OX-40, 4-1BB, CD30 y CD27.

35 Ligadores de péptidos

La molécula multifuncional puede ser un polipéptido de fusión que comprende uno o más aminoácidos interpuestos entre la primera y segunda partes que se unen a células, por ejemplo, un polipéptido de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos que puede unirse a una diana que lleva antígeno y una segunda secuencia de aminoácidos que puede unirse a un leucocito, y que comprende además al menos un aminoácido interpuesto entre la primera y segunda partes. Los aminoácidos interpuestos pueden comprender, por ejemplo, una secuencia de ligador prevista para reducir el impedimento estérico u otras interacciones no deseables entre la primera y segunda partes anteriormente mencionadas. Por ejemplo, un tipo de secuencia tal toma la forma $(\text{Gly}_x\text{Ser})_n$ en la cual n es un número entero de entre 1 y 15 y x es un número entero entre 1 y 10. Ligadores útiles adicionales incluyen, pero no se limitan a, $(\text{Arg-Ala-Arg-Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Val-Ala-Thr})_{1-5}$ (Xu y col., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 151-156), $(\text{Gly-Ser})_n$ (Shao y col., 2000, Bioconjug. Chem. 11: 822-826), $(\text{Thr-Ser-Pro})_n$ (Kroon y col., 2000, Eur. J. Biochem. 267: 6740-6752), (Gly-Gly-Gly) (Kluczyk y col., 2000, Peptides 21:-1411-1420) y $(\text{Glu-Lys})_n$ (Kluczyk y col., 2000, arriba) en las cuales n es 1 a 15. En otra realización no se interponen aminoácidos entre la primera y segunda partes.

Antígenos útiles según la invención

1. Antígenos virales

Ejemplos de antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, antígenos retrovirales tales como antígenos retrovirales de los antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tales como productos génicos de genes *gag*, *pol* y *env*, la proteína Nef, transcriptasa inversa, y otros componentes del VIH; antígenos virales de la hepatitis tales como las proteínas S, M y L del virus de la hepatitis B, el antígeno pre-S del virus de la hepatitis B, y otras hepatitis, por ejemplo, hepatitis A, B y C, componentes virales tales como ARN viral de hepatitis C, antígenos virales de la gripe tales como hemaglutinina y neuraminidasa y otros componentes virales de la gripe; antígenos virales del sarampión tales como la proteína de fusión del virus del sarampión y otros componentes del virus del sarampión; antígenos virales de la rubeola tales como las proteínas E1 y E2 y otros componentes del virus de la rubeola; antígenos rotavirales tales como VP7sc y otros componentes rotavirales; antígenos citomegalovirales tales como proteína de la envuelta B y otros componentes de antígeno citomegaloviral; antígenos virales sincitiales respiratorios tales como la proteína de fusión de RSV, la proteína M2 y otros componentes virales de antígenos sincitiales respiratorios; antígenos virales del herpes simple tales como proteínas tempranas inmediatas, glicoproteína D y otros componentes virales de antígenos del herpes simple; antígenos virales de la varicela zóster tales como gpl, gpII y otros componentes virales de antígenos de la varicela zóster; antígenos virales de la encefalitis japonesa tales como las proteínas E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A, 80%E, y otros componentes de antígenos virales de la encefalitis japonesa; antígenos virales de la rabia tales como glicoproteína de la rabia, nucleoproteína de la rabia y otros componentes de antígenos virales de la rabia. Véase Fundamental Virology, segunda edición, e's. Fields, B.N. y Knipe, D.M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales.

2. Antígenos bacterianos

Antígenos bacterianos que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos bacterianos de pertussis tales como toxina de pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina, FIM2, FIM3, adenilato ciclasa y otros componentes de antígenos bacterianos de pertussis; antígenos bacterianos de la difteria tales como toxina o toxoide diftérico y otros componentes de antígenos bacterianos de la difteria; antígenos bacterianos del tétanos tales como toxina o toxoide tetánico y otros componentes de antígenos bacterianos del tétanos; antígenos bacterianos estreptocócicos tales como proteínas M y otros componentes de antígenos bacterianos estreptocócicos; antígenos bacterianos de bacilos Gram-negativos tales como lipopolisacáridos y otros componentes de antígenos bacterianos Gram-negativos; antígenos bacterianos de *Mycobacterium tuberculosis* tales como ácido micólico, proteína de choque térmico 65 (HSP65), la gran proteína secretada de 30 kDa, antígeno 85A y otros componentes de antígenos micobacterianos; componentes de antígenos bacterianos de *Helicobacter pylori*; antígenos bacterianos neumocócicos tales como neumolisina, polisacáridos capsulares neumocócicos y otros componentes de antígenos bacterianos neumocócicos; antígenos bacterianos de *Haemophilus influenzae* tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos bacterianos de *Haemophilus influenzae*; antígenos bacterianos del carbunco tales como antígeno protector del carbunco y otros componentes de antígenos bacterianos del carbunco; antígenos bacterianos de rickettsiae tales como romps y otro componente de antígenos bacterianos de rickettsiae. También se incluyen con los antígenos bacterianos descritos en la presente memoria cualquier otro antígeno bacteriano, micobacteriano, micoplásmico, de rickettsia o de clamidia.

3. Antígenos fúngicos

Los antígenos fúngicos que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, componentes de antígenos fúngicos de *Candida*; antígenos fúngicos de histoplasma tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígenos fúngicos de histoplasma; antígenos fúngicos criptocócicos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos fúngicos criptocócicos; antígenos fúngicos coccidioides tales como antígenos de esférulas y otros componentes de antígenos fúngicos coccidioides; y antígenos fúngicos de la tina tales como tricofitina y otros componentes de antígenos fúngicos coccidioides.

4. Antígenos de parásito

Ejemplos de protozoos y otros antígenos parasíticos incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como antígenos de superficie de merozoítos, antígenos de superficie de esporozoítos, antígenos de circunsporozoítos, antígenos de superficie de gametocitos/gametos, antígeno del estadio de sangre pf 1 55/RESA y otros componentes de antígenos plasmodiales; antígenos de toxoplasma tales como SAG-1, p30 y otros componentes de antígenos de toxoplasma; antígenos de esquistosomas tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígenos de esquistosomas; *Leishmania major* y otros antígenos de leishmaniae tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígenos de leishmania; y antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígenos tripanosómicos.

5. Antígenos de tumor.

Los antígenos de tumor que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, componentes de telomerasa; proteínas de resistencia a múltiples fármacos tales como P-glicoproteína; MAGB-1, alfa fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, p53 mutante, inmunoglobulinas de tumores malignos derivados de linfocitos B, polipéptidos de fusión expresados a partir de genes que se han yuxtapuesto por translocalizaciones cromosómicas, gonadotropina coriónica humana, calcitonina, tirosinasa, antígenos del virus del papiloma, gangliósidos u otros componentes que contienen hidratos de carbono de melanoma u otras células tumorales. Se contempla por la invención que los antígenos de cualquier tipo de célula tumoral pueden usarse en las composiciones descritas en la presente memoria.

6. Antígenos que se relacionan con autoinmunidad.

Los antígenos que participan en enfermedades autoinmunitarias, alergia y rechazo de injerto pueden usarse en las composiciones de la invención. Por ejemplo, un antígeno que participa en una cualquiera o más de las siguientes enfermedades o trastornos autoinmunitarios puede usarse en la presente invención: diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, que incluye queratoconjuntivitis seca secundaria a síndrome de Sjögren, alopecia areata, respuestas alérgicas debidas a reacciones a picaduras de artrópodos, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgico, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por fármacos, reacciones de inversión leprosa, eritema nodoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, sordera parcial neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia eritrocitaria pura, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Crohn, oftalmopatía de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior y fibrosis pulmonar intersticial. Ejemplos de antígenos que participan en la enfermedad autoinmunitaria incluyen ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD 65), ADN nativo, proteína básica de la mielina, proteína proteolipídica de la mielina, componentes del receptor de acetilcolina, tiroglobulina y el receptor de la hormona estimulante tiroidea (TSH). Ejemplos de antígenos que participan en alergia incluyen antígenos del polen tales como antígenos del polen de cedro japonés, antígenos del polen de ambrosía, antígenos del polen de ballico, antígenos derivados de animal tales como antígenos de ácaros del polvo y antígenos felinos, antígenos de histocompatibilidad, y penicilina y otros fármacos terapéuticos. Ejemplos de antígenos que participan en el rechazo de injerto incluyen componentes antigénicos del injerto que va a trasplantarse en el receptor del injerto tal como corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón y componentes neurales del injerto. Un antígeno también puede ser un ligando de péptido alterado útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

Ejemplos de diversos antígenos que pueden usarse en las composiciones y procedimientos de la invención incluyen hormonas endógenas tales como hormonas luteinizantes, hormona estimulante del folículo, testosterona, hormona de crecimiento, prolactina y otras hormonas, fármacos de adicción tales como cocaína y heroína, y fragmentos idiotípicos de receptores de antígeno tales como porciones que contienen Fab de un anticuerpo anti-receptor de leptina.

Determinación de la unión de una molécula multifuncional a una diana que lleva antígeno o APC

Se conocen múltiples técnicas por aquellos expertos en la materia para detectar la unión proteína-proteína. Es decir, la unión de una molécula multifuncional de la invención a cualquiera o ambas de una diana que lleva antígeno y una APC.

La asociación entre la molécula multifuncional y una diana que lleva antígeno y/o una APC puede medirse, por ejemplo, por transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), en la cual un péptido (es decir, la molécula multifuncional) comprende un resto de marca fluorescente y la diana que lleva antígeno o APC aloja un segundo resto tal, y si la excitación a una longitud de onda apropiada puede producir absorción de fotones por una marca, seguido de FRET, y la emisión a una segunda longitud de onda característica del segundo fluoróforo, siendo esta emisión medida y correspondiente a la cantidad de diana que lleva antígeno o APC que está asociada con la molécula multifuncional. Alternativamente, esta asociación puede medirse en una de muchas otras formas que se describen más completamente más adelante.

Una "marca fluorescente" o "grupo fluorescente" se refiere a tanto un fluoróforo como una proteína fluorescente o fragmento fluorescente de la misma, o se refiere a un aminoácido fluorescente tal como triptófano que puede incorporarse en un polipéptido. "Proteína fluorescente" se refiere a cualquier proteína que fluoresce cuando se excita con radiación electromagnética apropiada. Ésta incluye proteínas cuyas secuencias de aminoácidos son tanto naturales como manipuladas.

5 Se prefiere adicionalmente que los fluoróforos comprendan fluoresceína y tetrametilrodamina u otro par adecuado. En otra realización preferida, la marca comprende dos proteínas fluorescentes diferentes. Se prefiere que las proteínas fluorescentes comprendan cualquier proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína verde fluorescente (GFP), proteína azul fluorescente, proteína roja fluorescente y otras formas manipuladas de GFP.

10 Preferentemente, el polipéptido comprende un aminoácido de cisteína mediante el que la marca se une mediante un enlace covalente. Más preferentemente, la marca puede unirse mediante un grupo amina primaria tal como mediante un residuo de lisina. Como será evidente para un experto en la materia, es preferible evitar usar la misma química para tanto marcar como inmovilizar polipéptidos de la invención. Por ejemplo, si el polipéptido se inmoviliza mediante residuos de cisteína, la marca se asocia ventajosamente mediante residuos de lisina.

15 Preferentemente, la medición se realiza por transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), anisotropía de fluorescencia o espectroscopía de correlación de fluorescencia, o midiendo la unión de un polipéptido asociado fluorescente a un polipéptido inmovilizado. Técnicas para realizar tales mediciones son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

20 Se prefiere que los medios emisores de fluorescencia comprendan dos fluoróforos diferentes, y particularmente se prefiere que los fluoróforos comprendan fluoresceína y tetrametilrodamina u otro par adecuado.

Como se usa en la presente memoria con respecto a marcas fluorescentes para su uso en FRET, el término "combinación apropiada" se refiere a una elección de marcas indicadoras de forma que el espectro de longitud de onda de emisión de uno (el resto "donante") esté dentro del espectro de longitud de onda de excitación del otro (el resto "aceptor").

25 Procedimientos de detección sin uso de marca se conocen en la técnica. Éstos incluyen detección usando resonancia de plasmones superficiales para detectar cambios en la masa de, por ejemplo, la molécula multifuncional, que se produciría si aumentara o disminuyera la unión del polipéptido asociado. Tales mediciones pueden hacerse, por ejemplo, usando una máquina BIACORE. En esta realización, la molécula multifuncional se inmoviliza sobre un soporte sólido antes de poner en contacto la molécula con el antígeno que lleva el resto y/o APC.

30 Además de los procedimientos anteriores, una técnica para determinar la unión de una molécula multifuncional de la invención a un antígeno que lleva resto y/o APC implica el uso de anticuerpos específicamente dirigidos a la molécula multifuncional. Brevemente, las células que llevan antígeno, por ejemplo, se incuban con la molécula multifuncional de la invención en RPMI 1640, u otro tampón adecuado, durante 1-4 horas a 37 °C con agitación. Las células se lavan entonces en PBS que contiene 2% de SBF, u otro suero de cultivo celular. Las células que llevan antígeno se incuban entonces con, por ejemplo, un anticuerpo anti-molécula multifuncional marcada con FITC durante 1 hora a 4 °C. Después del lavado adicional en PBS, las células se analizan por citometría de flujo, siendo la identificación de células marcadas indicativa de la unión de la molécula multifuncional de la invención a la célula que lleva antígeno.

40 Preparación de una célula que contiene un ácido nucleico recombinante según la invención

En una realización de la presente invención, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional de la presente invención se introduce en una célula huésped que puede expresar la molécula de ácido nucleico de manera que se produzca la molécula multifuncional. En una realización se permite que la célula huésped exprese el ácido nucleico *ex vivo*. En una realización alternativa, la célula huésped se transfecta con la molécula de ácido nucleico que codifica la molécula multifuncional, y luego se coloca de nuevo en el animal huésped del que se obtuvo, expresándose la molécula de polipéptido multifuncional *in vivo* en el animal huésped.

Las células huésped se transfectan, como se ha enseñado en la presente memoria, mediante procedimientos convencionales muy conocidos en la técnica. Procedimientos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook y col., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)), y otros manuales de laboratorio. Ejemplos adicionales de procedimientos de introducción de moléculas de ácidos nucleicos que codifican moléculas multifuncionales se describen a continuación. Las células que contienen las moléculas de ácidos nucleicos introducidas que codifican, por ejemplo, molécula multifuncional y/o un antígeno, pueden administrarse ellas mismas a un sujeto (como el antígeno), por ejemplo, en una composición de vacuna.

55 A. Introducción de ácido nucleico desnudo en células

1. *Transfección mediada por DEAE-dextrano*: Ácido nucleico desnudo puede introducirse en células formando una

mezcla del ácido nucleico y DEAE-dextrano e incubando la mezcla con las células. Puede añadirse una etapa de choque con sulfóxido de dimetilo o cloroquina para aumentar la cantidad de captación de ácido nucleico. La transfección con DEAE-dextrano es solo aplicable a modificación *in vitro* de células y puede usarse para introducir ácido nucleico transitoriamente en células, pero no se prefiere para crear células establemente transfectadas. Así, este procedimiento puede usarse para la producción a corto plazo de un producto génico, pero no es un procedimiento de elección para la producción a largo plazo de un producto génico. Protocolos para la transfección mediada por DEAE-dextrano pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., (e's.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.2 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Secciones 16.41-16.46 u otros manuales de laboratorio estándar.

2. *Electroporación*: También puede introducirse ácido nucleico desnudo en células incubando las células y el ácido nucleico juntos en un tampón apropiado y sometiendo las células a un pulso eléctrico de alto voltaje. La eficiencia con la que el ácido nucleico se introduce en células por electroporación está influida por la intensidad del campo aplicado, la duración del pulso eléctrico, la temperatura, la conformación y la concentración del ácido nucleico y la composición iónica de los medios. La electroporación puede usarse para transfectar establemente (o transitoriamente) una amplia variedad de tipos de células y es solo aplicable a modificación *in vitro* de células. Los protocolos para electroporar células pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., (e's.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.3 y en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Secciones 16.54-16.55 u otros manuales de laboratorio estándar.

3. *Transfección mediada por liposomas ("lipofección")*: Ácido nucleico desnudo puede introducirse en células mezclando el ácido nucleico con una suspensión de liposomas que contiene lípidos catiónicos. El complejo de ácido nucleico/liposoma se incuba entonces con células. La transfección mediada por liposomas puede usarse para transfectar establemente (o transitoriamente) células en cultivo *in vitro*. Los protocolos pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., (e's.) Greene Publishing Associates, (1989), Sección 9.4 y otros manuales de laboratorio estándar. Adicionalmente, la administración de genes *in vivo* se ha realizado usando liposomas. Véanse, por ejemplo, Nicolau y col., (1987) Meth. Enz. 149:157-176; Wang y Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. SA 84:7851-7855; Brigham y col., (1989) Am. J. Med. Sci. 298:278; y Gould-Fogerite y col., (1989) Gene 84:429-438.

4. *Inyección directa*: Ácido nucleico desnudo puede introducirse en células inyectando directamente el ácido nucleico en las células. Para un cultivo de células *in vitro*, el ácido nucleico puede introducirse por microinyección. Como cada célula se microinyecta individualmente, este enfoque es muy laborioso cuando se modifican grandes números de células. Sin embargo, una situación en la cual la microinyección es un procedimiento de elección es en la producción de animales no humanos transgénicos (tratado en mayor detalle más adelante). En esta situación, el ácido nucleico se introduce establemente en un ovocito fecundado que luego se deja desarrollar en un animal. El animal resultante contiene células que llevan el ácido nucleico introducido en el ovocito. La inyección directa también se ha usado para introducir ácido nucleico desnudo en células *in vivo* (véanse, por ejemplo, Acsadi y col., (1991) Nature 332: 815-818; Wolff y col., (1990) Science 247:1465-1468). Puede usarse un aparato de administración (por ejemplo, una "pistola de genes") para inyectar ADN en células *in vivo*. Un aparato tal está comercialmente disponible (por ejemplo, de BioRad).

5. *Captación de ADN mediada por receptor*: También puede introducirse ácido nucleico en células complejando el ácido nucleico con un catión, tal como polilisina, que se acopla a un ligando para un receptor de superficie celular (véanse, por ejemplo, Wu, G. y Wu, C.H. (1988) J. Biol. Chem 263:14621; Wilson y col., (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967; y la patente de EE.UU. nº 5.166.320). La unión del complejo de ácido nucleico-ligando al receptor facilita la captación del ácido nucleico por endocitosis mediada por receptor. Receptores a los que un complejo de ácido nucleico-ligando han elegido como diana incluyen el receptor de transferrina y el receptor de asialoglicoproteína. Un complejo de ácido nucleico-ligando ligado a cápsides de adenovirus que rompen naturalmente endosomas, liberando así material al citoplasma, puede usarse para prevenir la degradación del complejo por lisosomas intracelulares (véase, por ejemplo, Curiel y col., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850; Cristiano y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126). La captación de ácido nucleico mediada por receptor puede usarse para introducir ácido nucleico en células tanto *in vitro* como *in vivo* y, adicionalmente, tiene la característica añadida de que el ácido nucleico puede elegirse selectivamente como diana para un tipo de célula particular usando un ligando que se une a un receptor selectivamente expresado sobre una célula diana de interés.

Generalmente, cuando el ácido nucleico desnudo se introduce en células en cultivo (por ejemplo, por una de las técnicas de transfección descritas anteriormente), solo una pequeña fracción de células (aproximadamente 1 de las 105) integran normalmente el ácido nucleico transfectado en sus genomas (es decir, el ácido nucleico se mantiene en la célula episómicamente). Así, con el fin de identificar células que han captado ácido nucleico exógeno, es ventajoso transfectar ácido nucleico que codifica un marcador de selección en la célula junto con el (los) ácido(s) nucleico(s) de interés. Marcadores de selección preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos tales como G418, higromicina y metrotrexato. Alternativamente, un marcador de selección puede ser uno que emite una señal detectable tras la expresión tal como proteína verde fluorescente o proteína azul fluorescente. Los marcadores de selección pueden introducirse en el mismo plásmido que el (los) gen(es) de interés o pueden

introducirse sobre un plásmido separado.

B. Transferencia génica mediada por virus

Un enfoque preferido para introducir ácido nucleico que codifica un producto génico en una célula es por el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc, que codifica el producto génico. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de células reciben el ácido nucleico, que puede obviar la necesidad de selección de células que han recibido el ácido nucleico. Adicionalmente, moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficazmente en células que han captado ácido nucleico de vector viral y los sistemas de vector viral pueden usarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

1. *Retrovirus*: Los retrovirus defectuosos están bien caracterizados para su uso en la transferencia génica para fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271). Un retrovirus recombinante puede construirse teniendo un ácido nucleico que codifica un producto génico de interés insertado en el genoma retroviral. Adicionalmente, porciones del genoma retroviral pueden eliminarse para hacer defectuosa la replicación del retrovirus. Entonces, los retrovirus de replicación defectuosa se encapsidan en viriones que pueden usarse para infectar una célula diana mediante el uso de un virus auxiliar por técnicas convencionales. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. y col., (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio estándar. Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM, que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Ejemplos de líneas de virus de encapsidación adecuadas incluyen \square Crip, \square Cre, \square 2 y \square Am. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, que incluyen células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos, células de la médula ósea, *in vitro* y/o *in vivo* (véanse, por ejemplo, Eglitis, y col., (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano y col., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber y col., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry y col., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury y col., (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem y col., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay y col., (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai y col., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu y col., (1993) *J. Immunol.* 150:4104-115; patente de EE.UU. n° 4.868.116; patente de EE.UU. n° 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Los vectores retrovirales requieren división de la célula diana con el fin de que el genoma retroviral (y ácido nucleico extraño insertado en él) se integre en el genoma huésped para introducir establemente ácido nucleico en la célula. Así, puede ser necesario estimular la replicación de la célula diana.

2. *Adenovirus*: El genoma de un adenovirus puede manipularse de forma que codifique y exprese un producto génico de interés, pero se inactiva en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida viral lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner y col., (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld y col., (1991) *Science* 252:431-434; y Rosenfeld y col., (1992) *Cell* 68:143-155. Vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Adz, Ad3, Ad7, etc.) son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Los adenovirus recombinantes son ventajosos porque no requieren dividir las células para ser vehículos de administración de genes eficaces y pueden usarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, que incluyen epitelio de las vías respiratorias (Rosenfeld y col., (1992) citado arriba), células endoteliales (Lemarchand y col., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6482-6486), hepatocitos (Herz y Gerard (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816) y células de músculo (Quantin y col., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584). Adicionalmente, el ácido nucleico adenoviral introducido (y ADN extraño contenido en su interior) no se integra en el genoma de una célula huésped, pero sigue siendo episómico, evitando así posibles problemas que puedan producirse como resultado de mutagénesis insercional en situaciones en las que el ácido nucleico introducido se integra en el genoma huésped (por ejemplo, ADN retroviral). Además, la capacidad portadora del genoma adenoviral para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de administración de genes (Berkner y col., citado arriba; Haj-Ahmand y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267). La mayoría de los vectores adenovirales defectuosos en la replicación actualmente en uso son deletados para todo o partes de los genes E1 y E3 virales, pero retienen como mucho el 80% del material genético adenoviral.

3. *Virus adeno-asociados*: El virus adeno-asociados (AAV) es un virus defectuoso que se produce naturalmente que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para la eficaz replicación y un ciclo de vida productivo (para una revisión véase Muzyczka y col., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* (1992) 158:97-129). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen, y presenta una alta frecuencia de integración estable (véanse, por ejemplo, Flotte y col., (1992) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356; Samulski y col., (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McLaughlin y col., (1989) *J. Virol.* 62:1963-1973). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV pueden encapsidarse y pueden integrarse. El espacio para ácido nucleico exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 puede usarse para introducir ácido nucleico en células. Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en diferentes tipos de células usando vectores de AAV (véase, por ejemplo, Hermonat y col., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470; Tratschin y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Wondisford y col., (1988) *Mol. Endocrinol.* 2:32-39; Tratschin y col., (1984) *J. Virol.* 51:611 - 619; y Flotte y col.,

(1993) J. Biol. Chem. 268:3781-3790).

La eficacia de un sistema de vector de expresión particular y procedimiento de introducción de ácido nucleico en una célula puede evaluarse por enfoques convencionales rutinariamente usados en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico introducido en una célula puede detectarse por una técnica de hibridación con filtro (por ejemplo, transferencia Southern) y el ARN producido por transcripción del ácido nucleico introducido puede detectarse, por ejemplo, por transferencia Northern, protección de RNasa o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). El producto génico puede detectarse por un ensayo apropiado, por ejemplo, por detección inmunológica de una proteína producida, tal como con un anticuerpo específico, o por un ensayo funcional para detectar una actividad funcional del producto génico, tal como un ensayo enzimático. Si el producto génico de interés que va a expresarse por una célula no es fácilmente ensayable, un sistema de expresión puede primero optimizarse usando un gen indicador ligado a los elementos reguladores y el vector que va a usarse. El gen indicador codifica un producto génico que es fácilmente detectable y, así puede usarse para evaluar la eficacia del sistema. Genes indicadores convencionales usados en la materia incluyen genes que codifica beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, luciferasa y hormona de crecimiento humana.

Células útiles según la invención

La invención proporciona células huésped transfectadas con construcciones de ácidos nucleicos que codifican una molécula multifuncional de la invención. Las células huésped útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes.

Una célula huésped puede ser cualquier célula que pueda actuar de vehículo para un antígeno según la invención y así puede ser una célula nucleada o una célula procariótica en la que el ácido nucleico puede introducirse artificialmente. Célula procarióticas útiles según la invención incluyen células bacterianas. Células eucarióticas (nucleadas) útiles según la invención incluyen células de una levadura, hongo, células de un parásito y células de mamífero. Células de mamífero útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, que incluyen células mesenquimatosas especializadas tales como sinoviocitos; queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, leucocitos y células tumorales.

Líneas celulares útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, B16, células de fibrosarcoma CMS-5, células Cos1 y células CHO, TS/A, carcinoma de pulmón de Lewis, RENCA, carcinoma de próstata de ratas Dunning, y líneas celulares incluidas en el catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA).

Las células huésped que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional de la invención pueden prepararse a partir de células patógenas según la invención. Las células patógenas incluyen células tumorales (por ejemplo, células B16, células de fibrosarcoma CMS-5 y células derivadas de los tumores incluidos en la sección titulada "Tumores para los que la invención es útil"), y células derivadas de bacteria patógena, hongo patógeno, virus patógeno, parásito patógeno, o un artrópodo patógeno.

Procedimientos de detección de la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos recombinante artificialmente introducida

Se describen procedimientos de detección de una proteína (por ejemplo, una molécula multifuncional) que se expresa a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante que se ha introducido artificialmente en una célula.

Preparación de anticuerpos

Anticuerpos específicos para una proteína útiles según la invención (por ejemplo, una molécula multifuncional) son útiles para la purificación de proteínas, y para la detección de la expresión de estas proteínas a partir de células en las que se ha introducido una molécula de ácido nucleico recombinante que expresa estas proteínas. Por anticuerpo los presentes inventores incluyen construcciones que usan la región de unión (variable) de un anticuerpo tal, y otras modificaciones de anticuerpo. Así, un anticuerpo útil en la invención puede comprender un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un agregado de anticuerpos polifuncionales, o en general una sustancia que comprende uno o más sitios específicos de unión de un anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento tal como un fragmento Fv, Fab o F(ab')₂ o un derivado de los mismos, tal como un fragmento Fv monocatenario. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser no recombinante, recombinante o humanizado. El anticuerpo puede ser de un isotipo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, etc. Además, cuando corresponda, puede usarse un agregado, polímero, derivado y conjugado de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

Aunque un producto de proteína (o fragmento u oligopéptido de la misma) de una proteína según la invención (por ejemplo, una molécula multifuncional según la invención) que es útil para la producción de anticuerpos no requiera actividad biológica, debe ser antigénica. Los anticuerpos pueden dirigirse a cualquier porción de la molécula multifuncional de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo puede dirigirse a la porción de lectina de la molécula multifuncional o a la porción de ligando de la molécula multifuncional. Los péptidos usados para inducir anticuerpos específicos pueden tener una secuencia de aminoácidos que consiste en al menos cinco aminoácidos y preferentemente al menos 10 aminoácidos. Preferentemente, deben ser idénticas a una región de la proteína natural y puede contener la secuencia de aminoácidos entera de una molécula pequeña que se produce naturalmente.

Estiramientos cortos de aminoácidos correspondientes al producto de proteína de un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína útil según la invención (por ejemplo, una molécula multifuncional según la invención) pueden fusionarse con aminoácidos de otra proteína tal como hemocianina de lapa californiana o GST, y el anticuerpo se producirá contra la molécula quimérica. Pueden usarse procedimientos muy conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos para los productos de proteína de ácidos nucleicos recombinantes de la invención.

Para la producción de anticuerpos, diversos huéspedes que incluyen cabras, conejos, ratas, ratones, etc., pueden inmunizarse mediante inyección con los productos de proteína (o cualquier porción, fragmento u oligonucleótido de los mismos que retiene propiedades inmunogénicas) de las moléculas de ácido nucleico recombinantes que codifican proteínas útiles según la invención. Dependiendo de la especie de huésped, diversos adyuvantes pueden usarse para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (bacilos de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes humanos posiblemente útiles.

1. Anticuerpos policlonales.

La proteína de antígeno puede conjugarse con un vehículo convencional con el fin de aumentar su inmunogenicidad, y se producirá un antisuero para el conjugado péptido-vehículo. El acoplamiento de un péptido con una proteína portadora y las inmunizaciones pueden realizarse como se ha descrito (Dymecki y col., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 4815). El suero puede titularse contra antígeno de proteína por ELISA (más adelante) o alternativamente por transferencia por puntos o manchas (Boersma y Van Leeuwen, 1994, *J. Neurosci. Methods*, 51: 317). Al mismo tiempo, el antisuero puede usarse en secciones de tejido preparadas como se ha descrito. Un suero útil reaccionará fuertemente con los péptidos apropiados por ELISA, por ejemplo, siguiendo los procedimientos de Green y col., 1982, *Cell*, 28: 477.

2. Anticuerpos monoclonales

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales son muy conocidas, y pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando un antígeno candidato (por ejemplo, una molécula multiespecífica o una lectina cuyo nivel va a medirse o que está tanto inactivada como purificada por afinidad, preferentemente unida a un vehículo, como se describe por Arnheiter y col., 1981, *Nature*, 294:278

Los anticuerpos monoclonales se obtienen normalmente de los cultivos de tejido de hibridoma o de fluido ascítico obtenido de los animales en los que se introduce el tejido de hibridoma.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (o sueros policlonales) pueden cribarse para unir anticuerpo a la proteína diana.

3. Procedimientos de detección de anticuerpos

Pruebas inmunológicas particularmente preferidas se basan en el uso de tanto anticuerpos monoclonales como policlonales e incluyen inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), inmunotransferencia e inmunoprecipitación (véanse Voller, 1978, *Diagnostic Horizons*, 2:1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller y col., 1978, *J. Clin. Pathol.*, 31: 507; patente reexpedida de EE.UU. nº 31.006; patente de RU 2.019.408; Butler, 1981, *Methods Enzymol.*, 73: 482; Maggio, E. (ed.), 1980, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL) o radioinmunoensayos (RIA) (Weintraub, B., *Principles of radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, pág. 1-5, 46-49 y 68-78). Para analizar tejidos para la presencia o ausencia de una proteína producida por un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína útil según la invención (por ejemplo, molécula multifuncional o porción de la misma) pueden usarse técnicas inmunohistoquímicas. Será evidente para un experto en la materia que la molécula de anticuerpo puede tener que marcarse para facilitar la fácil detección de una proteína diana. Técnicas para marcar moléculas de anticuerpo son muy conocidas para aquellos expertos en la materia (véase Harlow y Lane, 1989, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory).

Determinar si una respuesta inmunitaria se modula o no según la invención

Las moléculas multifuncionales descritas en la presente memoria son útiles para modular una respuesta inmunitaria en un mamífero, preferentemente un ser humano, a un antígeno o antígenos contenidos en la diana que lleva antígeno que está unida a la porción de lectina de la molécula multifuncional. Una composición que comprende una molécula multifuncional unida a una diana que lleva antígeno puede administrarse a un animal, preferentemente un ser humano. La segunda porción de la molécula multifuncional que comprende un ligando para una molécula de la superficie celular de una APC elige como diana la composición para células presentadoras de antígeno en el animal al que se ha administrado la composición. La diana que lleva antígeno se recoge (es decir, se ingiere o fagocita) por células presentadoras de antígeno. Alternativamente, el complejo de molécula multifuncional/diana que lleva antígeno se pone en contacto con células presentadoras de antígeno *in vitro* en condiciones que permiten la fagocitosis, devolviéndose las APC posteriormente al organismo huésped del que se derivaron.

Se describe un procedimiento para modular una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende administrar al mamífero una composición que comprende al menos una molécula multifuncional como se describe en la presente memoria. En una realización, la composición comprende además una diana que lleva antígeno. En otra realización, la composición comprende todavía además una APC.

- 5 Una "respuesta inmunitaria" se refiere a estimulación/activación de una respuesta seleccionada que implica el sistema inmunitario, o supresión, eliminación o atenuación de una respuesta seleccionada. En una realización preferida, una respuesta inmunitaria se refiere a estimulación/activación de una respuesta seleccionada que implica el sistema inmunitario aproximadamente al menos el 5%, o preferentemente entre el 5 y el 50% o más, preferentemente entre el 50 y el 100% o al menos el 100% o más, o supresión, eliminación o atenuación de una
10 respuesta seleccionada aproximadamente al menos el 5%, o preferentemente entre el 5 y el 50% o más, preferentemente entre el 50 y el 100% o al menos el 100% o más, con respecto a células de control que no son células potenciadas por ligando CD40. Así, modular una respuesta inmunitaria significa que la respuesta deseada es más eficaz, más rápida, de mayor magnitud y/o más fácilmente inducida que cuando una diana que lleva antígeno se pone en contacto con una APC en ausencia de una molécula multifuncional. Diferentes respuestas inmunitarias
15 en el sujeto pueden modularse diferencialmente, por ejemplo, la respuesta inmunitaria celular puede potenciarse selectivamente mientras que la respuesta humoral puede atenuarse selectivamente, y viceversa.

Los siguientes ensayos *in vitro* e *in vivo* son útiles para determinar si una respuesta inmunitaria se modula o no según la invención. Los ensayos descritos en detalle más adelante miden la estimulación o supresión de respuestas inmunitarias celulares o humorales a un antígeno. Los antígenos citados en los siguientes ensayos son
20 representativos. Será evidente para un experto en la materia que una respuesta inmunitaria a un antígeno seleccionado útil según la invención puede medirse usando uno o más de los siguientes ensayos adaptando el ensayo al antígeno.

I. Detección de fagocitosis elevada

25 El siguiente ensayo puede usarse con el fin de determinar si células potenciadas por opsonina estimulan o no la fagocitosis por células presentadoras de antígeno.

La fagocitosis se examina usando monocitos que se han adherido a 37 °C durante 30 min en RPMI sin SBF añadido. Eritrocitos de oveja se incuban con una opsonina, o su precursor, en condiciones de forma que no más de 300 de tales moléculas, en promedio, se depositen sobre cada eritrocito. Si se usa un precursor, los eritrocitos recubiertos se procesan entonces para convertir todos los precursores en la molécula candidata actual (por ejemplo, véase
30 Carlo y col., J. Immunol. 123:523-8(1979)). Monocitos frescos se aíslan del sujeto, y 5×10^4 - 1×10^5 de estas células se suspenden en 0,25 - 0,5 ml de medio RPMI con 1% de BSA. Esta alícuota se dispone en un pocillo de cultivo de tejido y se incuba durante 30 min a 37 °C. Un exceso de eritrocitos recubiertos, suspensos a $1,2 \times 10^8$ células/ml, se reviste sobre los monocitos, la placa se centrifuga durante 5 min a 50 g y se incuba durante 30 min a 37 °C. El material no digerido se elimina en dos etapas de lisis hipotónica usando tampón de lisado frío en hielo
35 antes de la fijación y tinción de las células adherentes, y examinando las células bajo microscopía óptica. La fagocitosis se cuantifica determinando el porcentaje de 100 monocitos que ingieren una o más células diana, y se registra el número total de E ingeridos /100 monocitos (PI). La estimulación de la fagocitosis según la invención se indica por un índice fagocítico igual a o superior a 40.

Otro ensayo para fagocitosis es del siguiente modo: Células de la línea de macrófagos murinos se recogen y se suspenden en DMEM-10 a 4×10^5 /ml. 2,0 ml de esta suspensión se reparten en alícuotas en placas de cultivo celular de 3,5 cm individuales, y las placas se incuban a 37 °C en 5% de CO₂ durante la noche. Las células diana, además de las células de control, se recogen el mismo día que los macrófagos, se lavan en PBS y se resuspenden 2 min en colorante PKH26 (una disolución 2 µM en 1 ml del diluyente suministrado) a 5×10^6 células/ml. El colorante PKH26 fluorescente emite en el espectro rojo cuando se excita, mientras que la marca de FITC que se usa para los
45 fagocitos emite en el espectro verde. PKH26 es estable en el compartimento endosómico/lisosómico de fagocitos. Las células diana teñidas se lavan 3 veces con PBS y se cultivan durante la noche para permitir la filtración de PKH26 al medio. Esto minimiza la fuga de colorante durante el ensayo. Al día siguiente, las células diana se recogen, se lavan 3 veces con PBS y se resuspenden en DMEM sin suero a 5×10^5 /ml. Las células fagocíticas se aclaran vigorosamente con PBS sobre las placas de cultivo con el fin de eliminar el suero, y se añaden 2 ml de células diana a cada placa. Después de 0, 2, 4 u 8 h, las placas se aclaran 3 veces con PBS para eliminar todas las células no adheridas y las células restantes se incuban con EDTA 2 mM para liberarlas de la placa. Las células liberadas se lavan con 1% de SBF/PBS, y se suspenden en 100 µl del mismo tampón. Se añaden 2 µg de anticuerpo anti-fagocito (por ejemplo, anti-CR3) y las células se disponen sobre hielo durante 25 min. Las células se lavan 3 veces con 1% de SBF/PBS, se resuspenden en 100 µl de esta disolución y se tiñen con una dilución 1:25 de IgG
50 secundaria conjugada con FITC durante 25 min sobre hielo. Las células se lavan 3 veces y se resuspenden en 500 µl de 1% de SBF/PBS, luego se analizan en un Becton Dickinson FACScan con el software CellQuest.

La fluorescencia FL-1 (verde) se usa para seleccionar fagocitos. Entonces se mide la fluorescencia FL-2 (roja) de estas células, que refleja la internalización de células diana marcadas con PKH26. La fagocitosis inducida, por ejemplo, por una opsonina se indica por la diferencia entre la fluorescencia FL-2 media de macrófagos incubados
60 con células diana recubiertas con opsonina frente a no recubiertas con opsonina. El uso de una opsonina aumentará

la fluorescencia FL-2 media, por ejemplo, al menos el 10%, o suficiente para obtener un valor de p inferior a o igual a 0,05 por la prueba de la t de Student.

II. La amplificación de la respuesta inmunitaria normalmente implica proliferación de subpoblaciones particulares de células linfoides que están normalmente en el estado de reposo.

- 5 Los ensayos proliferativos tienen las siguientes aplicaciones en estudios clínicos: (1) Evaluación de la competencia inmunológica global de linfocitos T o linfocitos B como se manifiesta en su capacidad para responder a señales de proliferación policlonales tales como mitógenos o anticuerpos anti-CD3. Los defectos en la proliferación pueden ser indicativos de defecto inmunológico celular fundamental. La baja proliferación se encuentra frecuentemente como un efecto secundario no específico de enfermedad crónica. (2) La evaluación de una respuesta del individuo a antígenos específicos, si respuestas bajas son indicativas de defecto inmunológico general o específico. (3) Determinación de la compatibilidad del MHC por la reacción de linfocitos mixtos (MLR).

15 Además, los ensayos proliferativos son útiles para estimar la producción de linfocinas, investigar la transducción de señales y evaluar los requisitos de factores de crecimiento (por ejemplo, linfocinas) para linfocitos T o B. El procedimiento explicado resumidamente aquí mide la incorporación de [³H]timidina en ADN, que normalmente se correlaciona bien con el crecimiento celular como se mide por cambios en el número de células. Sin embargo, cuando el estímulo de activación es tóxico, como con activadores químicos tales como ionomicina más acetato de forbol miristato (PMA), el estallido de la nueva síntesis de ADN tras la activación puede no ir acompañado de un aumento neto en células viables, y, en realidad, puede observarse una disminución en el número de células. En este caso, la incorporación de [³H]timidina en ADN es más indicativa de estimulación de células iniciales que la estimación de número de células. Además, la incorporación de [³H]timidina proporciona información de las poblaciones de células, no de células individuales. Pueden usarse procedimientos alternativos, tales como citometría de flujo, para estudios que requieren ese tipo de información.

Ensayo para proliferación de linfocitos T inducida por antígeno

- 25 Este protocolo se diseña para probar la proliferación de linfocitos T en respuesta a un toxoide tetánico específico de antígeno. Puede modificarse para probar la proliferación de linfocitos T en respuesta a cualquier proteína o antígeno de polisacárido. Materiales: (Suspensión de linfocitos T, suspensión de células presentadoras de antígeno autólogas (no linfocitos T), disolución de toxoide tetánico (Connaught o Instituto del Laboratorio Estatal de Massachusetts)). (1) Contar linfocitos T y ajustar a 1×10^6 células/ml con RPMI-10 AB completo. (2) Tratar células presentadoras de antígeno con mitomicina C (o irradiar con 2500 rad) como en la etapa 2 del protocolo MLR de dirección única. (3) Ajustar la concentración de células presentadoras de antígeno a 2×10^5 células/ml. Las células presentadoras de antígeno pueden consistir en no linfocitos T autólogos o monocitos autólogos / macrófagos. (4) Añadir 100 ul de suspensión de linfocitos T y 50 ul de población de células presentadoras de antígeno a los pocillos; mezclar justo antes de dispensar. (5) Añadir 50 ul de disolución de toxoide tetánico para dar concentraciones finales de 0, 1, 5, 10 y 20 ug/ml. Preparar tres pocillos para cada dilución. (6) Incubar 6 días en una estufa de incubación humidificada a 37 °C, 5% de CO₂. (7) Pulsar con [³H]timidina y recoger como se describe en el protocolo de soporte.

Ensayo para proliferación celular dependiente de linfocinas

- 40 Este protocolo ensaya la proliferación dependiente de linfocinas de una población de linfocitos, en este caso, la proliferación dependiente de IL-4 de linfocitos B. Materiales: (Suspensión de linfocitos B de amígdalas, anti-IgM reticulada con perlas de Sepharose (Bio-Rad), 10.000 U/ml de IL-4 humana (Genzyme) en RPMI-10 completo). (1) Contar linfocitos B de amígdalas y ajustar la concentración a 1×10^6 células/ml con RPMI-10 completo. (2) Dispensar 100 ul de linfocitos B de amígdalas a cada pocillo. Preparar tres pocillos para cada condición experimental. (3) Diluir 10.000 U/ml de disolución de rIL-4 a 1:10, 1:100 y 1:1000. Añadir 20 ul de la disolución madre o dilución a pocillos apropiados para dar 1000 U/ml, 100 U/ml, 10 U/ml y 1 U/ml. Incluir un pocillo de control sin rIL-4. (4) Pipetear perlas anti-IgM en pocillos apropiados. (5) Determinar la concentración óptima de perlas con experimentos piloto. Es mejor incluir varias concentraciones de perlas en cada experimento para "agrupar" la dosis óptima. Preparar pocillos con linfocitos B de amígdalas y diluciones de IL-4 sola, perlas anti-IgM solas, medio de cultivo solo, y todas las combinaciones de diluciones de IL-4 y perlas anti-IgM. (6) Aumentar el volumen de cada pocillo a 200 ul con RPMI-10 completo según sea necesario. (7) Cultivar 5 días en una estufa de incubación humidificada a 37 °C, 5% de CO₂. (8) Pulsar con [³H]timidina y recoger como se describe en el protocolo de soporte.

Pulso de [³H]-timidina y recogida de cultivos celulares

- 55 Este protocolo se usa conjuntamente con los protocolos precedentes para completar el ensayo de incorporación de [³H]-timidina. (1) Añadir 20 ul de 50 uCi/ml de [³H]timidina a cada cultivo (1,0 uCi) en un momento fijo antes de terminar el cultivo (normalmente 6 ó 18 h). (2) Recoger los cultivos celulares usando un recolector de múltiples pocillos automatizado que aspira células, lisa células y transfiere ADN sobre papel de filtro, a la vez que permite lavar la [³H]timidina sin incorporar. Llenar y aspirar cada fila de la placa de microtitulación diez veces para garantizar la completa transferencia de células y la completa eliminación de timidina sin incorporar. Lavar cada tira de filtro con 100% de etanol para facilitar el secado. Transferir a viales de centelleo. Para el recolector semiautomatizado,

transferir puntos de filtro para cada pocillo a los viales de recuento por centelleo. Para la transferencia manual, secar los filtros bajo lámpara y transferir a vial de centelleo con pinzas. Añadir fluido de centelleo a cada vial. (3) Contar las muestras en contador de centelleo hasta que la desviación estándar sea inferior al 2%. Calcular las cpm medias para cultivos de referencia y para cada condición experimental. Debe haber menos del 20% de variación en cultivos duplicados.

III. Inducción y medición de respuestas *in vitro* de anticuerpos

La capacidad del sistema inmunitario humano para organizar una respuesta de anticuerpos tras la inmunización *in vivo* con una proteína o antígeno de polisacárido es una indicación reveladora de la integridad global de tanto los brazos de linfocitos B como T del sistema inmunitario. Como tal, la inmunización *in vivo* seguido de la medición de la respuesta de anticuerpos es una prueba apropiada de la función inmune en las diversas inmunodeficiencias adquiridas y congénitas y en un huésped de otras afecciones que afectan al sistema inmunitario. Los siguientes procedimientos son para inmunización *in vivo* y para la medición de la posterior respuesta inmunitaria usando una técnica de ELISA.

Ensayo inmuno-enzimático para citocinas usando anticuerpos marcados con NIP y HRPO

Este protocolo describe un ensayo inmunoenzimático para citocinas usando una reacción de inmunoensayo no competitiva heterogénea en la que la citocina se inmoviliza por un anticuerpo de recubrimiento unido a una placa de microtitulación. El material no unido se libera por lavado, y la detección se lleva a cabo usando un anticuerpo anti-citocina diferente marcado con el hapteno nitroyodofenilo (NIP). Éste se detecta a su vez por una peroxidasa de rábano picante (HRPO) conjugada de un anticuerpo anti-NIP, que se revela con el sustrato cromogénico ABTS. En este inmunoensayo no competitivo, la señal del inmunoensayo (A_{405}) aumenta como una función directa de la cantidad de citocina presente en la muestra. Los anticuerpos se preparan como se describe en Current Protocols in Immunology, 1995, 6.20.2 – 6.20.10.

Recubrir la placa de ensayo. (1) Usar un pipeteador multicanal, transferir 100 μ l de una dilución apropiada de anticuerpo de recubrimiento a todos los pocillos de la placa de ensayo que va a usarse. (2) Sellar las placas con sellante de placas de microtitulación o Parafilm e incubar 2 h a 37 °C. Preparar muestras y patrones en placa de preparación. (3) Diluir cada muestra (o alícuota de medio acondicionado) que va a ensayarse con un volumen igual de diluyente de inmunoensayo. (4) Pipetear menos de o igual a 1 ml de cada muestra diluida que va a ensayarse en la cámara superior de un dispositivo de microfiltración Spin-X separado. Microcentrifugar 5 min a 10.000 rpm y guardar los filtrados que se recogen en las cámaras inferiores. (5) Añadir 65 μ l de cada muestra diluida al pocillo apropiado de una placa de preparación (es decir, una placa de microtitulación de 96 pocillos separada). (6) Descongelar una alícuota de patrón de citocina a temperatura ambiente y asegurarse de que se mezcle bien. Pipetear 130 μ l en el pocillo de la placa de preparación que representa la mayor concentración sobre la curva patrón. Transferir 65 μ l de este pocillo al siguiente, luego continuar realizando diluciones 1:1 sucesivas en diluyente de inmunoensayo de manera que 65 μ l de cada concentración representada en la curva patrón se dispongan en el pocillo apropiado de la placa de preparación. (7) Descongelar una alícuota de calibrador a temperatura ambiente (si se usa). Diluir con un volumen igual de diluyente de inmunoensayo, luego pipetear 65 μ l de calibrador diluido en el pocillo o pocillos apropiados de la placa de preparación.

Incubar con anticuerpo de recubrimiento. (8) Sacar la placa de ensayo recubierta de la estufa de incubación. Sumergir en el vaso de precipitados de 2 litros lleno de 1 x tampón de lavado, luego invertir sobre el sumidero y golpear para eliminar el líquido. Repetir dos veces más, luego secar golpeando sobre toalla de papel. (9) Transferir 50 μ l de disolución de cada pocillo de la placa de preparación al pocillo correspondiente de la placa de ensayo usando el pipeteador multicanal. (10) Sellar la placa con sellante de placas de microtitulación o Parafilm e incubar 2 h a temperatura ambiente.

Incubar con anticuerpo de detección. (11) Diluir anticuerpo de detección marcado con NIP específico para citocina de interés a 1 μ g/ml en tampón de detección. (12) Lavar la placa de ensayo como en la etapa 8. (13) Añadir 75 μ l de anticuerpo de detección diluido de la etapa 11 a todos los pocillos de la placa de ensayo, que incluye paredes externas sin usar. (14) Volver a sellar la placa con sellante de placas de microtitulación o Parafilm e incubar 1 h a temperatura ambiente.

Incubar con anticuerpo anti-NIP conjugado con HRPO. (15) Diluir mAb anti-NIP conjugado con HRPO 1:3000 en tampón de detección. (16) Lavar la placa de ensayo como en la etapa 8. (17) Añadir 75 μ l de anticuerpo anti-NIP marcado con HRPO diluido de la etapa 15 a todos los pocillos de la placa de ensayo. (18) Volver a sellar la placa con sellante de placas de microtitulación o Parafilm e incubar 1 h a temperatura ambiente.

Incubar con sustrato cromogénico. (19) Lavar la placa de ensayo como en la etapa 8. (20) Añadir 100 μ l de disoluciones de trabajo de sustrato ABTS a todos los pocillos de la placa de ensayo. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente hasta que el desarrollo del color alcance el nivel deseado (generalmente hasta que A_{405} para los pocillos que contienen la mayor concentración de patrón esté entre 1,5 y 2). Este protocolo normalmente produce un ensayo que puede leerse después de 30 a 60 min.

Leer la placa y los datos de análisis. (21) Usar lector de placas de microtitulación con interfaz informática, medir la

absorbancia en todos los pocillos a 405 nm en modo de longitud de onda única o a 405 y 650 nm en modo de longitud de onda dual. (22) Ajustar los datos patrón a una curva descrita por una función matemática de primer grado (lineal), segundo grado (cuadrática) o de cuatro parámetros (no lineal) usando software de ajuste de curvas. (23) Interpolar los datos de absorbancia de muestras de citocinas desconocidas a la curva patrón ajustada, y calcular las concentraciones de citocina.

IV. La inducción de una respuesta de anticuerpos *in vivo* proporciona un enfoque a la evaluación de la integridad global del sistema inmunitario.

En los protocolos presentados aquí, los toxoides diftéricos y tetánicos se usan como antígenos de proteína representativos y los polisacáridos neumocócicos se usan como antígenos de polisacárido representativos debido a su seguridad y disponibilidad. Debe observarse, sin embargo, que es probable que las respuestas provocadas por estos antígenos sean respuestas secundarias debido a vacunación pasada o exposición natural. Para obtener una respuesta primaria debe usarse un antígeno inusual tal como hemocianina de lapa californiana.

Cuando se administran antígenos por la vía intramuscular o subcutánea, como aquí, se induce una respuesta inmunitaria "sistémica" y la medición del anticuerpo en circulación es lo más apropiado. Sin embargo, algunas veces es de interés evaluar respuestas inmunitarias "locales" o de la mucosa. En este caso, el antígeno se administra tanto intranasalmente para estimular tejido linfoide respiratorio como por vía oral para estimular tejido linfoide gastrointestinal, y se ensayan lavados bronquiales o fluidos intestinales, en vez de sangre, para el contenido de anticuerpo; además, se usan antígenos que son más apropiados para la estimulación de la respuesta local/de mucosa (es decir, antígeno del virus de la gripe para respuestas respiratorias y toxina del cólera para respuestas gastrointestinales).

En el ensayo de la respuesta *in vivo* de anticuerpos es importante determinar respuestas a tanto antígenos de proteína como de polisacárido debido a que estos antígenos estimulan diferentes componentes del sistema inmunitario. A este respecto, la mayor respuesta de los anticuerpos a antígeno de proteína está compuesta por anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG3, mientras que la mayor respuesta de los anticuerpos a antígeno de polisacárido está compuesta por anticuerpo de la subclase IgG2.

Se ha usado una variedad de técnicas de inmunoensayo para medir respuestas de anticuerpos en materiales obtenidos después de la inmunización *in vivo*. De éstas, el ensayo de ELISA es quizás el más útil debido a que da una lectura estable, fácilmente medible, reproducible y segura.

*Inducción de respuestas *in vivo* de anticuerpos a antígenos de proteína/polisacárido*

En este protocolo se administran antígenos por vía intramuscular o subcutánea y se recoge suero para la medición de respuestas. (1) Tomar muestra de sangre preinmunizada, dejar que la sangre coagule y separar el suero del coágulo por centrifugación. Guardar el suero a -20 °C a -70 °C en tubos de plástico apropiadamente etiquetados. (2) Inyectar 0,5 ml de la mezcla de toxoide a un sitio intramuscular apropiadamente preparado (deltoide o muslo), teniendo cuidado de no inyectar material intravenosamente. (3) Inyectar 0,5 ml de vacuna neumocócica polivalente en un sitio subcutáneo apropiadamente preparado, teniendo cuidado de no inyectar material intravenosamente. (4) Tomar muestras de sangre posinmunización a intervalos deseados, normalmente a 1, 2 y 3 semanas. Separar el suero y guardar a -20 °C a -70 °C. (5) Después de recoger todas las muestras de suero, ensayar las muestras para presencia de anticuerpos usando ELISA.

El ELISA ofrece un procedimiento rápido, sensible, reproducible y no radiactivo para medir respuestas *in vivo* de anticuerpos para una variedad de antígenos, que incluyen antígenos de proteína y de polisacárido en sueros obtenidos de los individuos vacunados con refuerzos del tétanos y la difteria y la vacuna de polisacárido neumocócica polivalente. Los ensayos específicos para tétanos, difteria y los polisacárido neumocócicos tipos I, II y III se detallan en Current Protocols in Immunology, 1995, vol. 6 y 7.

Ensayo que usa rechazo de tumor

En otro ensayo para inmunomodulación, un animal inmunocompetente se vacuna con en el orden de 10^4 - 10^8 células tumorales recubiertas con citocina irradiadas, y se exponen a en el orden de 10^4 - 10^8 células tumorales no mutantes vivas (en cualquier secuencia temporal). Si la supervivencia o la aparición de tumor en estos animales se diferencia de la del animal vacunado, usando parámetros idénticos, con células recubiertas con no citocina irradiadas en lugar de células potenciadas por opsonina, se ha producido inmunomodulación. Por ejemplo, si al menos el 10% de los animales en el grupo de prueba sobrevive el 100% más que la supervivencia media en el grupo de control, la prueba es positiva. Como otro ejemplo, la aparición de tumores en el 20% de los animales de prueba podría ser el 50% más tarde que la aparición media en los animales de control.

Dosificación y administración

Se describen procedimientos de modulación de una respuesta inmunitaria en un mamífero a un antígeno seleccionado, comprendiendo el procedimiento administrar a un mamífero una cantidad terapéutica de una composición que comprende una molécula multifuncional como se describe en la presente memoria, o una

composición que comprende una molécula multifuncional de la invención y una diana que lleva antígeno, o administrar una composición que comprende una cantidad terapéutica de APC que se ha puesto en contacto con una molécula multifuncional y diana que lleva antígeno *in vitro*.

5 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden prepararse como inyectables, tanto como disoluciones como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la infección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas. Los componentes inmunogénicos activos se mezclan frecuentemente con vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que no produce una reacción alérgica u otro efecto inapropiado en sujetos a los
10 que se administra. Como se usa en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" no incluye medio de cultivo, o cualquier disolución que contenga aproximadamente 0,2-2% de suero o más. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o
15 emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treoniil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominada nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-alanina-2'-1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (COP) 19835A, denominada MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2% de escualeno/Tween 80. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen DDA (bromuro de dimetildioctadecilamonio), adyuvantes completo e incompleto de Freund y QuilA. Además, sustancias inmunomoduladoras tales como linfocinas (por ejemplo, IFN-, IL-2 e IL-12) o inductores de IFN sintéticos tales como poli I:C pueden usarse en combinación con los adyuvantes descritos en la presente memoria.

25 Las composiciones de la invención pueden administrarse parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, tanto subcutáneamente como intramuscularmente. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios, y en algunos casos, formulaciones orales o formulaciones adecuadas para distribución como aerosoles. En el caso de las formulaciones orales, la manipulación de subconjuntos de linfocitos T empleando adyuvantes, encapsidación de antígeno, o la adición de citocinas individuales a diversas formulaciones,
30 puede producir vacunas orales mejoradas con respuestas inmunitarias optimizadas. Para supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferentemente del 1%-2%. Formulaciones orales incluyen excipientes tales normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de
35 magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen el 10%-95% de principio activo, preferentemente el 25-70%.

Las composiciones de la invención pueden formularse en composiciones de vacuna como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, maleico y similares. Sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, de amonio, cálcico o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

45 Cualquier componente celular de tales composiciones de vacuna puede someterse, en preparación para la inclusión en tales composiciones, a tratamientos que implican atenuación o inactivación de las células de la vacuna, que incluyen, por ejemplo, exposición a radiación ionizante, que puede inhibir la división celular, agentes antiproliferativos tales como ciclofosfamida, citocalasina D o colchicina, o destrucción con o sin fijación.

Las composiciones, que incluyen dianas que llevan antígeno y APC, se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en cantidad tal que serán profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces. La cantidad que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, que incluye, por ejemplo, capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseada. Intervalos de dosis adecuados están en el orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 µg a 1000 µg, tal como en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 300 µg, y preferentemente
55 en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 50 µg. Pautas adecuadas para la administración inicial y dosis de recuerdo también son variables, pero están tipificadas por una administración inicial seguida de posteriores inoculaciones u otras administraciones. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para ser administradas dependen del criterio del médico y pueden ser peculiares para cada sujeto. Será evidente para aquellos expertos en la materia que la cantidad terapéuticamente eficaz de células de la presente invención dependerá, entre otras cosas, del programa de administración, la dosis unitaria de antígeno administrada, si las células se administran o no en combinación con otros agentes terapéuticos, el estado inmune y la salud del receptor, y la actividad terapéutica de la composición particular.

Las composiciones pueden administrarse en un programa de dosis única, o preferentemente en un programa de múltiples dosis. Un programa de múltiples dosis es uno en el que un ciclo primario de vacunación puede incluir 1-10 dosis separadas, seguido de las otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y o reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, a 1-4 meses para una segunda dosis, y si se necesita, una dosis posterior(es) después de varios meses. Los refuerzos periódicos a intervalos de 1-5 años, normalmente 3 años, son preferibles para mantener los niveles deseados de inmunidad protectora. El ciclo de inmunización puede ir seguido de ensayos de proliferación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica (PBL) co-cultivados con ESAT6 o ST-CF, y midiendo los niveles de IFN liberado de los linfocitos sensibilizados. Los ensayos pueden realizarse usando marcas convencionales, tales como radionucleótidos, enzimas, marcas fluorescentes y similares. Estas técnicas son conocidas para un experto en la materia y pueden encontrarse en las patentes de EE.UU. 3.791.932, 4.174.384 y 3.949.064.

Tumores

También se describe el tratamiento de tumores, que incluye, pero no se limita a, los siguientes:

Melanomas, tumores de células escamosas, carcinomas de células basales, astrocitomas, gliomas, glioblastoma multiforme, meningiomas, ependimomas, schwannomas, neuroblastomas, retinoblastomas, meningiomas, tumores del glomus, sarcomas, que incluyen, por ejemplo, osteosarcomas, sarcomas de Ewing, condrosarcomas, miosarcomas, sarcomas de células sinoviales, fibrosarcomas, tumores de células en huso, angiosarcomas, tumores de células neuroectodérmicas primitivas y sarcomas de Kaposi, linfomas, leucemias agudas y crónicas, tumores de la cabeza y el cuello, carcinomas nasofaríngeos, carcinomas de la faringe, carcinomas de laringe, carcinomas de tiroides, carcinomas de paratiroides, timomas, carcinomas esofágicos, carcinomas gástricos, tumores del intestino delgado, carcinomas de colon y recto, mesoteliomas, carcinomas de pulmón, que incluyen adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas broncoalveolares y tumores de células pequeñas, carcinomas pancreáticos, tumores de células del islote y no células del islote, carcinomas de mama, mixomas cardíacos, tumores de la pituitaria, tumores carcinoides, hepatomas, colangiocarcinomas, hepatoblastomas, carcinomas de células renales, nefroblastomas, tumores de Wilm, carcinomas suprarrenales, feocromocitomas, tumores de células germinativas, coriocarcinomas, carcinomas de ovario, tumores testiculares, seminomas, tumores endometriales, carcinomas de la próstata, carcinomas de las vesículas seminales, tumores vaginales, carcinomas de pene, molas hidatiformes, carcinomas de la vesícula biliar y carcinomas de la vejiga urinaria.

Sujetos para el tratamiento

Se describe un procedimiento para reducir el tamaño y/o número de metástasis en un sujeto. El procedimiento comprende administrar al sujeto una composición de vacuna que comprende una molécula multifuncional. Un "sujeto" como se usa en la presente memoria puede referirse a un organismo del reino animal, preferentemente un mamífero, y todavía más preferentemente a un ser humano. Un "sujeto" también puede ser un animal en necesidad de terapia antimetástasis, por ejemplo, un paciente con metástasis malignas a uno o más órganos o tejidos, por ejemplo, un paciente humano con metástasis de pulmón o ganglio linfático. Un "sujeto" también puede ser un modelo animal de metástasis, en el que el animal se manipula, tanto genéticamente o mediante inyección de células malignas, como por otros procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, para simular la aparición de focos de células malignas o células infectadas que se observan en un animal similar con metástasis que se producen naturalmente. La generación de modelos animales de metástasis es muy conocida en la técnica, y ejemplos de tales modelos pueden encontrarse en, por ejemplo, Ryan MH y col., J Immunol. 2001;167:4286-92; Specht JM y col., J Exp Med. 1997; 186:1213-21; Nakanishi y col., Tumour Biol. 2003 24:70-6; Wang y col., Int J Gastrointest Cancer, 2001;29(1):37-46; Muralidharan y col., J Clin Laser Med Surg. 2003 21(2):75-83; Tanaka y col., Chest 2003, 123(4):1248-53; Huang y col., Clin Exp Metastasis 2002;19(4):359; y Irvine KR y col., J Immunol. 1996; 156:238-45. Un experto en la materia podría adaptar fácilmente los modelos animales de metástasis conocidos en la técnica para generar un modelo de metástasis de interés para cualquier aplicación dada.

Detección de metástasis

Se describe un procedimiento de reducción del número y/o tamaño de metástasis en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una molécula multifuncional como se describe en la presente memoria. Un experto en la materia reconocerá que la detección y medición de metástasis es rutinaria en la materia y puede llevarse a cabo usando procedimientos bien establecidos. Por ejemplo, las metástasis pueden detectarse usando examen macroscópico de un sujeto, tal como cirugía exploratoria (por ejemplo, laparotomía). Alternativamente, las metástasis pueden detectarse, medirse y/u observarse usando técnicas menos invasivas y procedimientos tales como toracoscopia, mediastinoscopia y laparoscopia. Un experto en la materia puede también detectar la presencia de metástasis usando técnicas de obtención de imágenes conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, obtención de imágenes radiográficas, tomografía computerizada (TAC), resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía de emisión de positrones (TEP), excitación de fotón único (SPECT) y escintigrafía de radionúclidos (por ejemplo, gammagrafía ósea). La sensibilidad de muchos de los procedimientos de obtención de imágenes anteriores puede potenciarse, como se conoce por aquellos expertos en la materia, mediante inyección o administración IV de agentes de contraste (por ejemplo, yodo o bario) a un sujeto del que van a obtenerse imágenes. Procedimientos adicionales para evaluar la presencia de, o detección, o

medición de metástasis es mediante el uso de examen patológico macroscópico o histológico (es decir, en el que una muestra de tejido se extrae de un sujeto y se examina a cualquiera o ambos del nivel anatómico macroscópico, o al nivel histológico o ultraestructural según procedimientos que son muy conocidos en la técnica). Los procedimientos anteriores para la detección, medición y obtención de imágenes de metástasis son conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden adaptarse según el conocimiento en la materia a tejidos, órganos o células particulares que un experto en la materia desea evaluar. Más descripciones detalladas de tales procedimientos pueden encontrarse en la materia, por ejemplo, the Oxford Textbook of Oncology, 2ª ed., Nueva York, Oxford University Press, 2002.

La metástasis se detecta si se detecta cualquier cantidad de metástasis en un sujeto. Es decir, tras la detección de incluso un único foco en un sujeto, puede decirse que se ha detectado la metástasis. Preferentemente, la metástasis se detecta como focos metastásicos plurales, en uno o preferentemente uno o más órganos en un sujeto.

Animales transgénicos

Una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula multifuncional como se describe en la presente memoria puede usarse para producir animales transgénicos no humanos, y células de tales animales transgénicos pueden aislarse y usarse en una formulación de vacuna en vacunación animal o humana.

Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se introduce en un ovocito fecundado o un citoblasto embrionario. Tales células pueden entonces usarse para crear animales transgénicos no humanos en los que moléculas de ácidos nucleicos exógenas que codifican los polipéptidos se han introducido en su genoma o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado moléculas de ácidos nucleicos endógenas. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad de las moléculas y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de las moléculas. Como se usa en la presente memoria, un "animal transgénico" es un animal no humano, se prefiere mamífero, más preferentemente un ratón, en el que una o más de las células del animal incluyen un transgén. Un transgén es ácido nucleico exógeno que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que sigue en el genoma del animal maduro, dirigiendo así la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico.

Un animal transgénico puede crearse introduciendo moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria (es decir, una molécula multifuncional) en los pronúcleos masculinos de un ovocito fecundado, por ejemplo, por microinyección, y dejando que el ovocito se desarrolle en un animal de cría hembra pseudopreñado. Secuencias intrónicas y señales de poliadenilación también pueden incluirse en el transgén para aumentar la eficiencia de expresión del transgén. Una secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejido puede(n) ligarse operativamente al transgén para dirigir la expresión de un polipéptido de la invención a células particulares. Procedimientos para generar animales transgénicos mediante manipulación y microinyección de embriones, particularmente animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.736.866 y 4.870.009, ambas por Leder y col., patente de EE.UU. nº 4.873.191 por Wagner y col., y en Hogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986). Procedimientos similares se usan para la producción de otros animales transgénicos. Un animal que resultó positivo transgénico puede identificarse basándose en la presencia de la molécula de ácido nucleico de la invención, por ejemplo, el transgén en su genoma y/o expresión de ARNm de transgén en tejidos o células de los animales. Un animal que resultó positivo transgénico puede entonces usarse para criar animales adicionales que llevan el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan un transgén que codifican polipéptidos pueden cruzarse adicionalmente con otros animales transgénicos que llevan otros transgenes.

La invención se ilustra adicionalmente por las siguientes ejemplificaciones que no deben interpretarse que son adicionalmente limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación de un GM-CSF murino fusionando con la secuencia señal de modificación de GPI Gas1 de *S. cerevisiae*

El punto de partida para producir un vector de expresión en levadura fue el plásmido de la secuencia señal de pUC19-GM-CSF-GPI de mamífero (pUC19-GM-CSF-GPI). Este plásmido codifica GM-CSF murino (en la dirección 5') fusionado en marco con la secuencia señal de modificación de GPI de Thy-1 humano (en la dirección 3'). Los dos siguientes oligonucleótidos se compraron de Midland Certified Reagent Company (Midland, TX):

GTX-5

5'pAAATCCGCGCCGGCACAGTGCTCAGAGACAAACTGGTCAAGTGTGAGGGCATCA
GCCTGTGGCTCAGAACACCTCGTGGCTGCTGCTCCTGCTGTCCCTCTCCCTCCT
CCAGGCCACGGATTCATGTCCCTGTGACTGGGTAC3'

GTX-5 comprende:

- a. Secuencias en el extremo 5' adecuadas para ligación con un sitio EcoRI (bases 1-5)
- 5 b. Un sitio NgoMI para crear una secuencia codificante quimérica en marco (bases 9-14)
- c. La secuencia codificante para la secuencia de modificación de GPI de Thy-1 humano (nº de acceso de GenBank M11749) (bases 15-137)
- d. Un codón de terminación (bases 138-140)
- e. Secuencias en el extremo 3' para ligación con un sitio KpnI (bases 144-148)

10 GTX-6

5'pCCAGTCACAGGGACATGAAATCCGTGGCCTGGAGGAGGGAGAGGGACAGCAGG
AGCAGCAGCAGCCACGAGGTGTTCTGAGCCAGCAGGCTGATGCCCTCACACTTGAC
CAGTTTGTCTCTGAGCACTGTGCCGGCGCGG3' (SEC ID N°: 5)

Este oligonucleótido es complementario a GTX-5, excepto para extremos en bisel:

15 GTX-5 y GTX-6 se disolvieron en tubos individuales en agua estéril a una concentración final de 1 microgramo/lambda. GTX-5 y GTX-6 se mezclaron a una concentración final de 100 ng/lambda y se dejaron hibridar durante 60 minutos a temperatura ambiente.

20 El oligonucleótido bicatenario de GTX-5:GTX-6 se clonó entonces en el plásmido pUC19. Cuatro microgramos de ADN de pUC19 se digirieron con EcoRI y KpnI. Después de la electroforesis, el ADN lineal se purificó a partir de un gel de agarosa al 0,7% usando un kit de purificación en gel de Qiagen (Santa Clarita, CA) según instrucciones proporcionadas por el fabricante. 100 ng del oligonucleótido GTX-5:GTX-6 se ligaron a 200 ng de pUC19 digerido con EcoRI-KpnI en un volumen final de 20 microlitros a temperatura ambiente durante 60 minutos.

25 El plásmido se transformó en células AG-1 competentes, que se compraron de Stratagene. *E. coli* transformadas se inocularon sobre placas de LB-amp. Se eligieron colonias bacterianas cultivadas sobre placas de LB que contenían ampicilina (100 microgramos/ml) y se inocularon en un ml de LB con amp y se cultivaron durante la noche a 37° con agitación.

30 Se aisló ADN de plásmido usando un protocolo Mini-prep de lisis alcalina convencional y el ADN se digirió con EcoRI y KpnI. El ADN se sometió a electroforesis sobre geles de agarosa al 1,6% teñidos con bromuro de etidio, y así se identificaron las colonias que contenían un fragmento de EcoRI-KpnI de aproximadamente 148 pb. Las colonias positivas se inocularon en 100 ml de LB con ampicilina y se cultivaron durante la noche. El ADN de plásmido se purificó de nuevo usando kits comprados de Qiagen.

35 Se secuenció la secuencia de nucleótidos de un clon positivo para Thy-GPI, designado pUC-GPI 21, confirmando su identidad.

La secuencia codificante de GM-CSF se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de pulmón de ratón comprada de Clontech. Se realizó PCR durante 35 ciclos usando pfu polimerasa y los siguientes cebadores:

En la dirección 5'

35 5'CCGAATTCATGTGGCTGCAGAATTTACTTTTCCTGGGCATTGTGGTCTAC3' (SEC ID N°: 6)

En la dirección 3'

5'CAGCCGGCTTTTTGGACTGGTTTTTGCATTCAAAGGGGATATCAGTCAG3' (SEC ID N°: 7)

Los parámetros de PCR fueron desnaturalización a 90° durante 1 minuto, hibridación a 60° durante 1 minuto y extensión a 72° durante 1 minuto.

40 El producto de PCR de cadena de GM-CSF se purificó después de la electroforesis mediante un gel de agarosa al 1%. La banda de ADN se escindió y el fragmento de ADN se purificó usando un kit comprado de Qiagen.

El fragmento de ADN de GM-CSF purificado se digirió con EcoRI y NgoMI. Después de la digestión, la mezcla de reacción se extrajo con fenol:cloroformo (1:1), seguido de cloroformo. La fase acuosa se ajustó a acetato sódico 0,3 M a pH 5,2 y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -80° durante 2 horas. El ADN se sedimentó por centrifugación, el etanol se eliminó y el sedimento se aclaró con 70% de etanol. El sedimento se secó a vacío.

5 El ADN de GM-CSF se resuspendió en agua estéril y se ligó a pUC19-GPI 21 que se había digerido con EcoRI-NgoMI. La ligación fue durante una hora a temperatura ambiente. Se usó pUC19-GPI 21 ligado a ADN de GM-CSF para transformar células AG-1 competentes. Se seleccionaron células AG-1 transformadas sobre placas de LB con ampicilina. Se aisló ADN de plásmido y se analizó como antes. Se realizaron digestiones de restricción para confirmar la construcción quimérica pUC19 GPI-GM-CSF. El ADN de varios clones positivos se aisló y se secuenció.

10 Este plásmido se digirió con NgoM IV y KpnI, y el mayor fragmento resultante se aisló después de la electroforesis mediante un gel de agarosa al 1%.

La secuencia señal de modificación de 280 pb de GPI de la proteína de levadura Gas1 se amplificó por PCR a partir del clon de cósmido de levadura C9952 (ATCC). Esta PCR empleó *pfu* polimerasa y los cebadores:

Cebador en la dirección 5' 5'GTAGCCGGCGCTAGCTCGGGGTCTTCTTCCAAGTCTA (SEC ID N°: 8)

15 Cebador en la dirección 3' 5'TACGGTACCCCTAGGCCACAATGAAATAAGATACCATACC3' (SEC ID N°: 9)

Estos cebadores añaden un sitio NgoM IV a 5' y un sitio KpnI a 3' al fragmento Gas1.

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90°	un minuto
	Hibridación	60°	un minuto
	Extensión	72°	un minuto
	Ciclos	25	

20 El producto de PCR se purificó después de la electroforesis mediante un gel de agarosa al 1% y se digirió con NgoM IV y KpnI. La secuencia señal de GPI Gas1 se ligó entonces en el plásmido pUC19-GM-CSF-GPI preparado anteriormente de manera que la secuencia señal Gas1 se fusionó en marco en la dirección 3' de la secuencia de GM-CSF, sustituyendo la secuencia de Thy-1. Este vector se llama pUC19-GM-CSF-Gas1.1. Entonces, el plásmido resultante se transformó en *E. coli* competente para AG-1 (Stratagene) y los clones de plásmido se aislaron por mini-prep de lisis alcalina. Entonces, los plásmidos se cribaron para insertos por digestión con restricción. Se secuenció ADN de un clon positivo para confirmar la identidad de la región codificante de GAS1.

25 Entonces se generó un plásmido de expresión de levadura para GPI-GM-CSF utilizando el vector pITY-4, que fue amablemente proporcionado por el Dr. K. Dane Wittrup (Universidad de Illinois). Este plásmido se integra establemente en el genoma de levadura y permite la expresión de alto nivel de genes heterólogos. Las características de pITY-4 incluyen: una secuencia delta (LTR del elemento Ty) que permite múltiples eventos de integración por recombinación homóloga; un gen de resistencia a *neo*/kanamicina que proporciona selección en *E. coli* y selección ajustable en levadura; el promotor Gall para transcripción inducible de alto nivel; un sitio de clonación EagI único; una secuencia Pre-Pro sintética optimizada para secreción eficaz de genes expresados; la secuencia de terminación del factor alfa; y un origen de replicación para la propagación en *E. coli*. En este sistema, la levadura se cultiva en medios que contienen dextrosa durante 3 días, luego se cambian a medios que contienen galactosa para inducir la transcripción de genes insertados en la dirección 3' del promotor Gal1.

35 El inserto GM-CSF-Gas1 descrito anteriormente se amplificó por PCR a partir de pUC19-GM-CSF-Gas1.1 usando *pfu* polimerasa y los cebadores:

En la dirección 5' 5'TACGGCCGGCACCCACCCGCTCACCC3' (SEC ID N°: 10)

En la dirección 3' 5'TACGGCCGCCACAATGAAATAAGATACCAT3' (SEC ID N°: 11)

Estos cebadores añaden sitios EagI a ambos extremos para la clonación en el plásmido pITY-4.

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90°	un minuto
	Hibridación	60°	un minuto
	Extensión	72°	un minuto
	Ciclos	25	

El producto de PCR se purificó después de la electroforesis mediante un gel de agarosa al 1% y se digirió con EagI. El fragmento GM-CSF-Gas1 flanqueado con EagI se ligó en pTY-4 digerido con EagI y se usó para transformar células AG1 de *E. coli*. Entonces, *E. coli* se cultivaron sobre placas de LB que contenían kanamicina (100 ug/ml). Los plásmidos de colonias resistentes a kanamicina se purificaron por mini-prep y se mapearon por digestiones de restricción para la presencia y correcta orientación de insertos. La identidad de un clon positivo se confirmó por secuenciación. Este plásmido se llama pTY-GM-CSF-Gas1.1.

Ejemplo 2. Expresión de GM-CSF murino fusionado con la secuencia señal de modificación de GPI Gas1 en levadura

Un cultivo de 50 ml del clon de *E. coli* que contiene pTY-GM-CSF-Gas1.1 se cultivó en LB con 100 ug/ml de kanamicina y el plásmido se purificó usando un kit Midi-Prep de Qiagen. La cepa BJ5464 de *S. cerevisiae* (ATCC) se transformó entonces con pTY-GM-CSF-Gas1.1 usando un protocolo con acetato de litio (LiAc). Un cultivo de 10 ml durante la noche de BJ5464 en YPD (por litro: 20 g de bacto triptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de dextrosa) se usó para inocular un matraz de 100 ml. La levadura se cultivó durante 3 horas a 30 °C y luego se recogió por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con agua estéril y se centrifugaron de nuevo. Las células se resuspendieron en 1,0 ml de LiAc 100 mM, se transfirieron a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugaron en una microcentrifuga Eppendorf a la velocidad más alta durante 15 segundos. Las células se resuspendieron entonces en 0,5 ml de LiAc 100 mM y muestras de 50 ul se repartieron en alícuotas en tubos individuales. Las células se sedimentaron. Luego se añadieron 240 ul de PEG (50% en peso/volumen), 36 ul de LiAc 1,0 M, 5 ul (10 mg/ml) de ADN portador hervido (ADN de esperma de salmón, Sigma) y 2 ug de plásmido en 75 ul de agua, en este orden. Después de la adición del plásmido, el tubo se agitó con vórtex, se incubó a 30 °C durante 30 minutos y se sometió a choque térmico a 42° durante 15 minutos. Entonces, las células se sedimentaron, se resuspendieron en agua estéril y se sembraron en placas YPD que contenían 1 mg/ml de G418.

Se eligieron colonias individuales de levadura resistente a G418 y se cultivaron en un ml de YPD con 1 mg/ml de G418 durante 3 días. Las células se sedimentaron entonces por centrifugación en una microcentrifuga y el medio YPD (que contiene dextrosa, sin galactosa) se sustituyó con YPG (20 g de bacto triptona, 10 g de extracto de levadura, 20 g de galactosa por litro) con 1 mg/ml de G418. La levadura se cultivó en YPG durante 3 días para permitir la inducción completa de la transcripción a partir del promotor de Gal1. Después de la inducción, las células se sedimentaron, se lavaron con TN (NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 7,4) y se lisaron en TN que contenía glucopiranosido de octilo 20 mM (OGP), PMSF 1 mM y 1 ug/ml de cada aprotinina, leupeptina y pepstatina. La levadura se lisó por agitación con vórtex con perlas de vidrio lavadas con ácido (425-600 micrómetros, Sigma). El material insoluble se sedimentó y el sobrenadante se ensayó usando un ELISA de GM-CSF murino (Endogen). Se identificó una colonia que expresaba altos niveles de GPI-GM-CSF. Basándose en la curva patrón de GM-CSF soluble, los presentes inventores estiman que la expresión es aproximadamente 25 ug/l, una mejora significativa con respecto a la expresión de mamífero y suficiente para experimentos *in vivo*. Este clon de levadura se designa SC-GM-GPI.

Una de las ventajas de integrar establemente vectores para la expresión en levadura es que, después de la clonación inicial y el aislamiento de colonias, ya no se requiere el mantenimiento del antibiótico. Para confirmar esto se cultivaron células con y sin G418 y se probaron para expresión de GPI-GM-CSF. Los presentes inventores no han observado disminución en los niveles de expresión en ausencia de G418 durante 8 meses.

Para producir GPI-GM-CSF en una escala adecuada para caracterización funcional *in vitro* e *in vivo*, 500 ml de YPD se inocularon con SC-GM-GPI y se cultivaron durante tres días a 30 °C con agitación. Las células se sedimentaron por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron a un volumen igual de YPG durante tres días adicionales de crecimiento. Entonces, las células se sedimentaron, se lavaron con TN y se lisaron en 25 ml de TN que contenía OGP 20 mM, PMSF 1 mM y 1 ug/ml de cada aprotinina, leupeptina y pepstatina. Entonces, las células se lisaron por agitación con vórtex con perlas de vidrio lavadas con ácido, 20 g/500 ml de cultivo (425-600 micrómetros, Sigma). El material insoluble se sedimentó a 8.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el material soluble se aplicó a una columna de inmunoafinidad de anticuerpo monoclonal anti-GM-CSF murino (Endogen) ligado a Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma). El acoplamiento del monoclonal a Sepharose se realizó según las instrucciones del fabricante. La eficiencia del acoplamiento se monitorizó usando DO₂₈₀ y la unión de GM-CSF murino al anticuerpo inmovilizado se confirmó usando citocina recombinante comercialmente disponible.

Se aplicó material derivado de levadura soluble a la columna y se dejó circular por gravedad. La columna se lavó secuencialmente con: (a) 20 volúmenes de TN con 1% de Triton X-100; (b) 5 volúmenes de Tris 50 mM a pH 8,0, OGP 1 mM; (c) 20 volúmenes TN con OGP 1 mM. Entonces, el material unido se eluyó con 10 volúmenes de NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 2,5 con OGP 1 mM. El material eluido se neutralizó con 1/200 volumen de Tris 1,5 M a pH 8,8. El material purificado se concentró usando un dispositivo centrífugo Microsep 3K (Pall Gelman Laboratory). Se determinó por ELISA (Endogen) que los rendimientos de GPI-GM-CSF eran 25 ug/l de cultivo. La concentración final se ajustó a 40 ug/ml mediante la adición de NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 7,4 con OGP 1 mM.

Se analizó GPI-GM-CSF purificado por gel teñido y transferencia Western. Aproximadamente 1 ug de GPI-GM-CSF purificado o GM-CSF murino soluble recombinante por carril se sometió a electroforesis. Entonces, los geles se

5 tiñeron con nitrato de plata usando el kit de tinción con plata Sigma según indicaciones del fabricante (Sigma). Para transferencias Western, los geles se transfirieron a Protran BA83 (Schleicher y Schuell) usando un aparato de inmunotransferencia eléctrico de Owl Scientific y se bloquearon con TBS (solución salina tamponada con Tris) que contenía 0,05% de Tween 20 y 2% de leche desnatada en polvo durante la noche a temperatura ambiente.

10 Entonces, la transferencia se incubó con anticuerpo primario (monoclonal de rata anti-GM-CSF murino, Endogen) a dilución 1:5000 en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. La transferencia se lavó con TBS-0,05% de Tween 20 y se incubó con un anticuerpo secundario, de cabra anti-IgG de rata conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) a 1:10.000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, el color se desarrolló con NBT-BCIP (Sigma). Una única banda dominante que migraba a aproximadamente la misma tasa que el patrón de GM-CSF soluble recombinante estuvo claramente presente en tanto el gel como la transferencia (el peso molecular del resto de GPI es solo aproximadamente 1500 en comparación con aproximadamente 14.000 para el resto de proteína]. Dada la inmunorreactividad con anti-GM-CSF y la capacidad de este material para unirse a membranas de celulares tumores, estas bandas parecen representar GPI-GM-CSF. Aunque algún material de alto peso molecular, posiblemente que representa agregados, es visible en la transferencia, este material no es visible en la tinción con plata menos sensible, que indica que está presente en menor cantidad que la banda dominante.

Ejemplo 3. Unión de GM-CSF murino fusionado con la secuencia señal de modificación de GPI Gas1 para células

20 Se cultivaron células de fibrosarcoma murino CMS-5 no mutantes en DMEM, 10% de SBF, se recogieron con Pen-Strep, se lavaron dos veces con RPMI 1640 (Life Technologies) y se resuspendieron en RPMI 1640 a una concentración de 5×10^5 células/ml. Alícuotas de 0,9 ml de la suspensión de células se dispensaron a tubos de microcentrifuga siliconizados Eppendorf. Cada alícuota recibió tanto 1 ug de GPI-GM-CSF purificado preparado como en el Ejemplo 2, 1 ug de GM-CSF murino recombinante soluble (Intergen, suministrado como polvo liofilizado y reconstituido a 40 ug/ml en el mismo tampón que GPI-GM-CSF) como medio solo. Entonces, las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C con agitación y luego se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF.

25 Para la detección de GPI-GM-CSF por citometría de flujo, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal de rata anti-GM-CSF murino (Endogen) durante una hora a 4 °C. Entonces, las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF, y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de rata marcada con FITC (Sigma) durante una hora a 4 °C, y de nuevo se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF. Las células se analizaron por citometría de flujo en un Becton-Dickinson FACScalibur. La decoloración con GPI-GM-CSF provocó un aumento de aproximadamente 10 veces en la fluorescencia FL-1 pico y media con respecto a células incubadas con medio solo. A diferencia, las células incubadas con GM-CSF soluble tuvieron prácticamente el mismo perfil que las células negativas de control: Estos datos indican que GPI-GM-CSF, pero no GM-CSF recombinante soluble, puede unirse a células tumorales.

35 También se detectó GPI-GM-CSF asociado a células CMS-5 y se cuantificó por ELISA. Las células CMS-5 se recogieron y se lavaron como se ha descrito anteriormente. 1×10^6 células en 1 ml de RPMI 1640 se incubaron con 1 ug de GPI-GM-CSF purificado. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF. El sedimento de células se lisó con 50 microlitros de PBS que contenía 0,15% de desoxicolato y el detergente se diluyó posteriormente mediante la adición de 200 microlitros de PBS. El material se diluyó sucesivamente con PBS y las cantidades de GM-CSF se determinaron usando un kit de ELISA (Endogen) contra un patrón de GM-CSF recombinante soluble proporcionado por el fabricante. Basándose en estos datos, el número medio de moléculas de GPI-GM-CSF incorporadas/célula durante cinco experimentos fue 37.000 +/- 33.000. La gran desviación estándar fue debida a un experimento en el que el número de moléculas/célula fue 66.000. Excluyendo este experimento, la media fue 29.500 +/- 4.500.

45 La "decoloración" de células de melanoma murino B16 con GPI-GM-CSF también se cuantificó por ELISA. La decoloración y el ELISA se realizaron exactamente como se describe para las células CMS-5. El número medio de moléculas/célula para tres experimentos fue 21.000 +/- 11.500.

Ejemplo 4. Estabilidad de GM-CSF murino fusionado con las secuencias señal de modificación de GPI Gas1 en células

50 Para estudiar la estabilidad de GPI-GM-CSF incorporado en células, células CMS-5 se recogieron y se decoloraron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Después de la decoloración, las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF y luego se resuspendieron a 4×10^6 células/ml en RPMI 1640. Las células se irradiaron a 3500 rad de una fuente de ^{137}Cs . Entonces, las células se incubaron a 37 °C en 5% de CO_2 y se tomaron alícuotas a intervalos de horas, se lavaron tres veces y se lisaron en 50 ul de PBS con 0,15% de desoxicolato. Entonces se añadieron 200 ul de PBS para diluir el desoxicolato. GM-CSF asociado a células se midió por ELISA. Incluso a las 6 horas, las células mostraron solo aproximadamente una pérdida del 20% de GPI-GM-CSF de la superficie celular. Después de 6 horas, la viabilidad de células irradiadas (tanto decoloradas como no decoloradas) como se mide por inspección microscópica con tinción con azul de tripano estuvo significativamente comprometida. Sin embargo, datos *in vivo* (véase más adelante) indican que tanto la retención de la superficie celular de GPI-GM-CSF como la viabilidad celular posirradiación son suficientes para sostener un efecto biológico.

Ejemplo 5. Bioactividad de GM-CSF murino fusionado con la secuencia señal de modificación de GPI Gas1 para células

La bioactividad de GPI-GM-CSF se ensayó determinando la capacidad de las moléculas para soportar la proliferación de la línea celular FDC-P1, una línea celular dependiente de GM-CSF derivada de médula ósea murina. La proliferación de células FDC se midió con el ELISA de proliferación celular Biotrak (Amersham Pharmacia), un ensayo que utiliza el análogo de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Células WEHI (ATCC) se cultivaron en MEM de Iscove, 10% de SBF, penicilina-estreptomicina, como fuente de medio acondicionado para células FDC-P1. Las células FDC-P1 se cultivaron en DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomicina con 25% de medio acondicionado WEHI, se recogieron y se lavaron 3 veces con DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomicina. Las células se resuspendieron a 1×10^5 /ml en DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomicina y 100 μ l se repartieron en alícuotas en pocillos individuales de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los grupos, hechos por triplicado, fueron del siguiente modo:

- A. Medio - Sin células
- B. Células FDC-PI - Sin estimular
- 15 C. Células FDC-PI + 10 ng de GM-CSF soluble
- D. Células FDC-PI + 10 ng de GM-CSF como GPI-GM-CSF (como se ha determinado por ELISA contra patrón de GM-CSF)
- E. Células FDC-PI + 10 ng de GPI-GM-CSF (como en "D") desnaturalizado por extracción de la proteína con cloroformo:metanol (3:1) seguido de precipitación con acetona y resuspensión.
- 20 Todas las disoluciones de proteína se diluyeron a 100 ng/ml en NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 7,4 con OGP 1 mM, de manera que el volumen añadido a cada pocillo fue 100 μ l.

El ensayo de proliferación no isotópico se realizó según las instrucciones del fabricante. Las células sembradas se cultivaron durante dos días a 37 °C en 5% de CO₂. En el día 3, 10 μ l de la disolución BrdU se añadieron a pocillos individuales y las células se incubaron durante 3 más horas. La placa se centrifugó entonces a 300 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se eliminó. La placa se secó incubando a 60 °C durante una hora. La placa se fijó entonces y se bloqueó según las instrucciones del fabricante. Entonces, las células fijadas se incubaron con anti-BrdU marcado con peroxidasa durante 90 minutos. Entonces, los pocillos se lavaron y el color se desarrolló con TMB según las instrucciones del fabricante. En dos experimentos, GPI-GM-CSF sostuvo coherentemente la proliferación a un nivel alto superior (aproximadamente el 25%) a GM-CSF recombinante soluble, que indica que GPI-GM-CSF es suprabioactivo. El efecto de GPI-GM-CSF no fue debido al resto de GPI solo, ya que GPI-GM-CSF desnaturalizado no soportó la proliferación. El resto de GPI permaneció ligado a la proteína después de la desnaturalización, ya que la proteína todavía podía decolorar células como se demuestra por ELISA, que reconoce epítopes lineales sobre GM-CSF.

Ejemplo 6. Inmunización eficaz con células mezcladas con GPI-GM-CSF

- 35 Estos experimentos incluyeron ratones vacunados con:
- (a) Células no mutantes (WT)
 - (b) Células incubadas con GM-CSF soluble - Sin lavar (GM-CSF total en dosis: 1 microgramo)
 - (c) Células decoloradas con GPI-GM-CSF - GPI-GM-CSF sin unir lavado tras la incubación (GPI-GM-CSF total en dosis: 0,74 nanogramos por ELISA [media de 2 experimentos; 73 y 75 ng individualmente])
 - 40 (d) Células decoloradas con GPI-GM-CSF - Sin lavar (GM-CSF total en dosis: 1 microgramo)

Los valores de masa y concentración de GPI-GM-CSF se expresan en términos de equivalencia a GM-CSF como se ha determinado por ELISA contra un patrón de GM-CSF soluble.

Células CMS-5 se cultivaron al 70% de confluencia en DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomicina, se recogieron por tripsinación y se lavaron 3 veces con RPMI 1640. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y entonces las células se resuspendieron a una concentración de 4×10^6 células/ml y alícuotas de 1 μ l se dispensaron a tubos de microcentrífuga siliconizados. Las células se incubaron con 1 μ g de GPI-GM-CSF o 1 μ g de GM-CSF murino recombinante soluble por 10^6 células durante 3 horas a 37 °C. Los grupos "lavados" se lavaron entonces 3 veces con PBS, 2% de SBF y se resuspendieron a 4×10^6 células/ml en RPMI 1640. Se tomó una alícuota de las células decoloradas de GPI-GM-CSF lavadas y la cantidad de GM-CSF asociado a células se midió por ELISA como se ha descrito anteriormente. Hubo aproximadamente 31.000 y 32.000 moléculas de GPI-GM-CSF/célula en los grupos decolorados lavados en los dos experimentos, respectivamente.

Las células se irradiaron a 3500 rads de una fuente de ^{137}Cs . Ratones BALB/c hembra de 8-10 semanas de edad (que son singeneicos para CMS-5) se anestesiaron por inhalación de metofano y se vacunaron subcutáneamente en el pliegue inguinal izquierdo con 1×10^6 células en 0,25 ml. Siete días después, las células CMS-5 no mutantes se recogieron al 70% de confluencia y se lavaron 3 veces en HBSS. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y las células se ajustaron a $4 \times 10^6/\text{ml}$ en HBSS. Entonces, los ratones previamente vacunados se inyectaron subcutáneamente detrás del cuello, bajo anestesia con metofano, con 2×10^6 células CMS-5 no mutantes vivas en 0,5 ml de HBSS.

El desarrollo del tumor se evaluó diariamente por palpación e inspección visual. La "aparición" se definió como el primer día en el que una masa tumoral fue tanto palpable como visible. El observador se cegó a la vacuna recibida por cada conjunto de ratones para protegerse del favoritismo. Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO_2 cuando los tumores se convirtieron en difíciles de manejar. Los experimentos se terminaron 70 días después de la exposición del tumor, como se había planeado de antemano.

Se reúnen datos de tres experimentos para grupos de vacuna sin lavar de GPI-GM-CSF, de GM-CSF soluble y no mutante. Los datos para estos grupos incluyen los de controles sin agotar en un experimento de agotamiento de subconjuntos de linfocitos. Se reúnen datos para el grupo lavado de GPI-GM-CSF de dos experimentos, ya que este grupo no se incluyó en el experimento de agotamiento inicial. El experimento de agotamiento tuvo 4 ratones/grupo, y los otros experimentos tuvieron 5/grupo. En términos de números de ratones total, $n = 14$ para GPI-GM-CSF sin lavar; 10 para GPI-GM-CSF lavado; 14 para GM-CSF soluble sin lavar; y 14 para WT. Los porcentajes aproximados de ratones que sobreviven sin tumor hasta el día 70 después de la exposición fueron: WT, 15%; GM-CSF soluble, 50%; GPI-GM-CSF lavado, 60%; GPI-GM-CSF sin lavar, 85%. Así, aún cuando la vacuna lavada de GPI-GM-CSF contuvo más de mil veces menos GM-CSF que la soluble sin lavar, la administración de células decoloradas con GPI-GM-CSF fue más eficaz. Además, la vacuna de GPI-GM-CSF sin lavar en la que algunas moléculas no estuvieron asociadas a una célula fue incluso más eficaz.

Ejemplo 7. Clonación y expresión de GM-CSF humano fusionado con la secuencia señal de modificación de GPI Gas 1

GM-CSF humano se amplifica por PCR de una biblioteca de ADNc de linfocitos T humanos (Clontech) usando Pfu polimerasa (Stratagene). Se usan los siguientes cebadores:

En la dirección 5'

5'GCGAATCCCGGCCGCGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCC (SEC ID N°: 12)

En la dirección 3'

5'CAGCCGGCCTCCTGGACTGGCTCCCAGCAGTC (SEC ID N°: 13)

El cebador en la dirección 5' contiene sitios de restricción EcoRI y EagI inmediatamente precedentes al primer aminoácido encontrado en la proteína GM-CSF humana madura. Como la expresión en *S. cerevisiae* utiliza una secuencia conductora de levadura, la clonación de GM-CSF humano empieza en el extremo N de la proteína madura. Cada cebador en la dirección 3' omite el codón de terminación nativo para permitir en marco la ligación a la secuencia que codifica la señal de modificación de GPI Gas1. El cebador en la dirección 3' contiene un sitio de restricción NgoM IV, de acuerdo con sitios de restricción usados en otras construcciones.

Los parámetros de PCR son:	desnaturalización	a 97 °C durante 1 minuto,
	hibridación	a 56 °C durante 1 minuto, y
	extensión	a 72 °C durante 2 minutos.

La PCR se realiza para el menor número de ciclos dando una banda visible en electroforesis en gel de agarosa. Después de la amplificación, la mezcla de reacción se deja enfriar a 4 °C durante 10 minutos.

El producto de PCR se aísla por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1% y se eluye de la banda de agarosa cortada usando un kit comercialmente disponible (Qiagen). El fragmento de ADN de hGM-CSF purificado se digiere con EcoRI y NgoM IV y se liga al plásmido pUC19 GM-CSF-GPI (murina) que se ha digerido con EcoRI y NgoM IV. Éste sustituye GM-CSF murino con su homólogo humano. El plásmido pUC19-hGM-CSF-GPI se transforma entonces en células AG-1 de *E. coli* competentes, se eligen 30 colonias para mini-cultivo y los clones de plásmido se aíslan y se purifican usando kits comercialmente disponibles (Qiagen). Los clones positivos se identifican por digestión con la prueba de enzima de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Las colonias de *E. coli* positivas se cultivan durante la noche en maxi-cultivo y sus plásmidos se purifican usando kits maxi-prep de Qiagen. Se secuencian los insertos.

Para clonar GM-CSF GAS1g en el vector de expresión pTY-4, la PCR de esta construcción se realiza a partir del vector pUC19. Los cebadores son:

5'TACGGCCGGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCC (SEC ID N°: 14)

3'TACGGCCGCCACAATGAAAATAAGATACCAT (SEC ID N°: 15)

5 El cebador en la dirección 5' tiene un sitio EagI inmediatamente precedente al primer codón de GM-CSF maduro. Éste elimina la señal de secreción de mamífero y permite la ligación en marco a la secuencia señal de levadura. El mismo sitio de restricción puede usarse en cuanto a la construcción de ratón debido a que está ausente en la secuencia humana. El cebador en la dirección 3' añade un sitio EagI al extremo 3'. Se realiza PCR usando Pfu polimerasa durante 25 ciclos. Las condiciones para PCR son: desnaturalización 90 °C un minuto, hibridación 60 °C un minuto, extensión 72 °C un minuto. Después de la amplificación, la mezcla de reacción se deja enfriar a 4 °C durante 10 minutos.

15 El producto de PCR se aísla por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1% y se eluye de la banda de agarosa cortada usando un kit comercialmente disponible (Qiagen). El GM-CSF GAS1g purificado de fragmento de ADN se digiere con EagI, se liga a pTY-4 y se transforma en bacterias AG-1 químicamente competentes (Stratagene). Se eligen 30 colonias para mini-cultivo y los clones de plásmido se aíslan y se purifican usando kits comercialmente disponibles (Qiagen). Los clones positivos se identifican por digestión con la prueba de enzima de restricción y electroforesis en gel de agarosa. Las colonias de *E. coli* positivas se cultivan durante la noche en maxi-cultivo y sus plásmidos se purifican usando kits maxi-prep de Qiagen. Se secuencian los insertos.

20 La molécula de GPI-GM-CSF humano se expresa en *S. cerevisiae* como se ha descrito para la molécula murina en el Ejemplo 2. La purificación por inmutafinidad se realiza como se ha descrito en el Ejemplo 2, sustituyendo un anticuerpo anti-GM-CSF humano con el anticuerpo anti-GM-CSF murino. El ELISA para detectar y cuantificar la molécula, tanto en aislamiento como unida a una diana que lleva antígeno, se realiza usando un anticuerpo monoclonal anti-GM-CSF humano, ya que es citometría de flujo sobre células decoloradas con la molécula.

Ejemplo 8. Clonación de GM-CSF/proteínas quiméricas de hemaglutinina de la gripe

25 pUC19 GM-CSF-K-GAS1.1

pUC19 GM-CSF-K-HA se clonó a partir de pUC19 GM-CSF-K-Gas1.1, que los presentes inventores produjeron en su laboratorio. Este plásmido incluye una secuencia que codifica GM-CSF murino fusionado con la secuencia de modificación de glicosilfosfatidilinositol en la dirección 3' derivada de la proteína GAS1 de levadura (la última obtenida del Dr. D. Wittrup, Universidad de Illinois). Una secuencia de ligador se interpone entre porciones de GM-CSF y GAS1. Para insertar la secuencia de ligador, el plásmido pUC19 GM-CSF-Gas1.1, también previamente producido en el laboratorio de los presentes inventores, se digirió con NgoM IV y NheI. Estas enzimas de restricción cortan en el extremo 3' de la molécula de GM-CSF y en el extremo 5' de la secuencia de Gas1.1, respectivamente. El plásmido resultante se purificó después de la electroforesis mediante gel de agarosa usando un kit fabricado por Qiagen. Se compraron los siguientes oligonucleótidos:

35 5' CCGGCACTAGTGGCGGAGGGGGCTCCGGCGGGGGGCAGCG (SEC ID N°: 16)

5' CTAGCGCTGCCCCGCCGCGCCCTCCGCCACTAGTG (SEC ID N°: 17)

Los oligonucleótidos sintéticos contienen:

1. Nucleótidos protuberantes en 5' que se hibridan con ADN de plásmido digerido con NgoM IV
2. Nucleótidos protuberantes en 3' que se hibridan con ADN de plásmido digerido con Nhe I
- 40 3. Secuencia de ADN que codifica el péptido GGGGSGGGGS (SEC ID N°: 18) en la que G representa glicina y S representa serina. Esta secuencia de 10 aminoácidos (G₄S)₂ se diseña para insertar una torcedura/espaciador en la proteína entre GM-CSF y los restos de Gas1.1.
4. Sitio SpeI para permitir la confirmación de la clonación del fragmento pequeño y para manipulaciones adicionales.

45 Los dos oligonucleótidos se mezclaron en concentraciones equimolares, se hirvieron durante 2 minutos y se dejaron hibridar a temperatura ambiente. El oligonucleótido se ligó en el plásmido digerido con NgoM IV - Nhe I y el plásmido se usó para transformar la cepa AG-1 de *E. coli*. Los transformantes se seleccionaron sobre placas de LB que contenían 100 ug/ml de ampicilina. El ADN de plásmido se aisló, se digirió con Spe I y se sometió a electroforesis sobre geles de agarosa para confirmar la presencia de la secuencia de (G₄S)₂.

50

pUC19 GM-CSF-K-hemaglutinina (HA)

5 Se produjo el plásmido pUC19 GM-CSF-K-HA, que codifica una proteína quimérica que contiene (de extremo amino a extremo carboxi): (1) GM-CSF murino; (2) el ligador (G₄S)₂ descrito anteriormente; y (3) el dominio de HA1 de la HA H1 de la cepa aislada de la gripe A A/PR/8/34. La secuencia de HA1 usada (aminoácidos 18 a 344 del precursor de HA) omite la secuencia conductora del extremo N y el dominio de HA2 en la dirección 3'. Un codón de terminación se añadió después del aminoácido 344.

10 pUC19 GM-CSF-K-Gas1.1 se digirió con Nhe I y Kpn I. Nhe I corta en el extremo 5' de la secuencia codificante de Gas1.1 y Kpn I corta en el extremo 3' de la secuencia codificante de Gas1.1, respectivamente. El plásmido resultante con la región codificante de GPI eliminada se purificó después de la electroforesis mediante gel de agarosa usando un kit fabricado por Qiagen. La secuencia codificante de HA1 se clonó por PCR a partir de un plásmido que codifica el gen HA de la cepa A/PR/8/34 de la gripe. La secuencia de HA1 usada empieza en el aminoácido 18, el inicio de la proteína madura, es decir, que carece de la secuencia señal de la secreción. El extremo 3' se corresponde con el aminoácido 344, que elimina la región transmembrana y que sustituye un codón de terminación. Los cebadores para PCR de la secuencia de HA1 fueron del siguiente modo:

15 Cebador de HA1 en la dirección 5'

5' ATGCTAGCGACACAATATGTATAGGC (SEC ID N°: 19)

Cebador de HA1 en la dirección HA1

5' ATGGTACCCGGCCGTTATCATCTGGATTGAATGGACGG (SEC ID N°: 20)

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

20 La PCR se realizó durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

25 Tras la PCR, el producto se sometió a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el ADNc de HA1 se extrajo del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN de HA1 purificado se digirió con Nhe I y Kpn I. Para preparar la proteína de fusión, el fragmento de HA Nhe I - Kpn I purificado se ligó en el vector pUC19 GM-CSF-K-Gas1.1 que se había digerido con Nhe I y Kpn I para eliminar la región codificante de Gas1.1. El ADN se usó para transformar AG1 de *E. coli* y los transformantes se seleccionaron sobre placas de LB-ampicilina. El ADN de plásmido de colonias individuales se aisló y se digirió con enzimas de restricción. Las digestiones de restricción identificaron un plásmido de pUC19 GM-CSF-K-HA.

El plásmido pUC19 GM-CSF-K-HA se purificó según las instrucciones del fabricante usando un kit comprado de Qiagen.

30 Ejemplo 9. Clonación de GM-CSF-K-HA en vector de expresión en levadura

Se usó PCR de pUC19 GM-CSF-K-HA para aislar un fragmento de ADN que codifica GM-CSF-K-HA para clonación en un vector de expresión en levadura. El producto de PCR contiene sitios de clonación Eag I para la inserción en marco en el vector de expresión en levadura.

Cebador en la dirección 5'

35 5' TACGGCCGGCACCCACCCGCTCACCC (SEC ID N° 21)

Cebador en la dirección 3'

5' ATGGTACCCGGCCGTTATCATCTGGATTGAATGGACGG (SEC ID N° 22)

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

La PCR se realizó durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

40 Tras la PCR, el producto se sometió a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el gen GM-CSF-K-HA se extrajo del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN purificado se

digirió con Eag I y se ligó al vector de expresión en levadura ITK que se había digerido con Eag I. El vector ITK se diseñó para (1) replicación en *E. coli* y (2) expresión de genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de la integración estable usando recombinación homóloga. El vector contiene:

1. Secuencias para la replicación del plásmido en *E. coli*
- 5 2. Promotor Gal de levadura para la expresión de genes heterólogos en la levadura cultivada en medios que contienen galactosa.
3. PrePro - Secuencia de ADN sintética, optimizada para la secreción y escisión de la secuencia señal de genes distales en levadura.
4. Sitio Eag I único para la clonación de genes que van a expresarse.
- 10 5. Terminador alfa - Secuencia de ADN para la eficaz terminación de genes proximales.
6. Secuencia delta que permite la integración estable del plásmido por recombinación con secuencias delta endógenas en el cromosoma de levadura.
7. Gen de resistencia a antibióticos que permite la selección en *E. coli* con kanamicina y selección en levadura con G418.

15 Este plásmido se usó para transformar la cepa AG-1 de *E. coli*. Se seleccionaron transformantes por crecimiento sobre placas de LB que contenían 100 ug/ml de kanamicina. Las colonias individuales se cultivaron en medio LB que contenía kanamicina y los plásmidos se purificaron. Las digestiones de restricción determinaron la orientación de los insertos. El plásmido resultante ITK GM-CSF-K-HA se purificó usando un kit comprado de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

20 Ejemplo 10. Expresión de GM-CSF-K-HA en levadura

El plásmido purificado se linealizó con Mfe I y se usó para transformar la cepa de levadura WDHY131 de *Saccharomyces cerevisiae* usando acetato de litio (LiAc). Un cultivo de 10 ml de *S. cerevisiae* cultivado a saturación a 30 °C en medio YPD (por litro/ 20 g de bacto triptona; 20 g de dextrosa; 10 g de extracto de levadura) se usó para inocular 100 ml de YPD. El cultivo se cultivó a 30 °C con agitación durante 3 horas. La levadura se recogió por centrifugación a 11.000 x g durante 2 minutos y se resuspendió en 25 ml de agua estéril. La levadura se centrifugó como antes y se resuspendió en 1,0 ml de acetato de litio 100 mM y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La levadura se sedimentó por centrifugación a 12.000 x g durante 15 segundos y el sobrenadante se eliminó. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de LiAc 100 mM. Se añadieron 50 ul de suspensión de células a tubos de microcentrífuga individuales y se centrifugaron como antes. El sobrenadante se eliminó.

30 La mezcla de transformación añadida al sedimento de levadura consistió en: 240 ul de PEG (50% en peso/volumen); 36 ul de LiAc 1,0 M; 5 ul de ADN monocatenario (10 mg/ml) y 1 ug de ITK GM-CSF-K-HA linealizado en 75 ul de agua. La mezcla se agitó con vórtex para resuspender el sedimento de células y se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Entonces, las células se sometieron a choque a 42 °C durante 15 minutos, se centrifugaron para sedimentar las células y se resuspendieron en 0,5 ml de YPD. La levadura se incubó en medio YPD durante 3 horas y se sembró sobre placas YPD que contenían 2 mg/ml de G418. Las placas se cultivaron a 30 °C durante 3 días hasta que aparecieron las colonias individuales. Para cribar para la expresión de GM-CSF-K-HA, colonias individuales se cultivaron en 1 ml de medio YPD a 30 °C durante 2 días. Las células se centrifugaron a 8.000 x g durante 2 minutos y el medio YPD se eliminó y se sustituyó con 1 ml de medio YPG (por litro/ 20 g de bacto triptona; 20 g de galactosa; 10 g de extracto de levadura) para la inducción del promotor gal. La levadura se cultivó en medio YPG durante 2 días. En este momento se tomó una alícuota y las células se sedimentaron. El sobrenadante se probó para expresión de GM-CSF usando un kit de ELISA comprado de Endogen. El protocolo fue según el fabricante. Se identificó un clon de levadura de alta expresión que secretaba la proteína quimérica GM-CSF-K-HA. Basándose en la curva patrón de GM-CSF soluble, el nivel de expresión fue aproximadamente 2,4 mg/l de resto de GM-CSF.

45 Ejemplo 11. Producción de pUC19 HA (hemaglutinina) - K- GM-CSF

También se produjo el plásmido pUC19 HA-K-GM-CSF, que codifica una proteína quimérica que contiene (de extremo amino a extremo carboxi): (1) un dominio de HA1 (2) K, el ligador (G₄S)₂ descrito anteriormente, y (3) GM-CSF murino. HA1 empieza en el extremo amino de la proteína madura, aminoácido 18, eliminando la secuencia conductora. El extremo 3' termina en el aminoácido 344. (G₄S)₂ se ha añadido para suministrar un ligador flexible. GM-CSF empieza en el aminoácido 18 de la proteína GM-CSF, correspondiente al primer aminoácido de la proteína madura.

La secuencia de HA-K se clonó primero por PCR de la secuencia codificante de HA1 a partir de un plásmido que codifica el gen HA de la cepa A/PR/8/34 de la gripe.

Cebador en la dirección 5'

5' CTGAATTCCGGCCGGACACAATATGTATAGGC (SEC ID N°: 23)

Cebador en la dirección 3'

5' ATGGTACCGCTGCCCCGCGCCGGAGCCCCCTCCGCCACTTCTGGATTGAATGGAC GGAAT (SEC ID N°: 24)

5 Los oligonucleótidos para PCR generan un ácido nucleico con:

1. Un sitio EcoRI en 5' en el extremo amino de la HA madura
2. El ligador (G₄S)₂ en el extremo carboxi del dominio de HA1 (aminoácido 344 del precursor de HA)
3. Un sitio Kpn I distal al extremo de la secuencia (G₄S)₂

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

10 La PCR se realizó durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

Tras la PCR, el producto se sometió a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el ADN de HA1-K se extrajo del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN de HA-K purificado se digirió con EcoRI y Kpn I y el fragmento se clonó en pUC19 que se había digerido con EcoRI y KpnI. El plásmido se usó para transformar AG-1 de *E. coli* a amp^r. Se eligieron colonias individuales y se cultivaron en LB-amp. La identidad de los plásmidos con el inserto correcto se determinó por mapeo de restricción. El plásmido resultante llamado pUC19 HA-K se purificó usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

15

El fragmento de GM-CSF se clonó por PCR.

Cebador en la dirección 5'

5' ACGGTACCGCACCCACCCGCTCACCCATC (SEC ID N°: 25)

20 Cebador en la dirección 3'

5' TAGGATCCCGGCCGTCAATTTTGGACTGGTTTTTGCACG (SEC ID N°: 26)

Los cebadores de PCR generan un fragmento de GM-CSF con

1. Un sitio KpnI en 5' que permite la traducción en marco de la porción (G₄S)₂ de la molécula de HA-K al inicio de la molécula de GM-CSF madura en el aminoácido 18.
- 25 2. Un codón de terminación en el extremo 3' de GM-CSF
3. Sitio BamHI en 3'

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

La PCR se realizó durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

Tras la PCR, el producto se sometió a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el gen GM-CSF se extrajo del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado se digirió con Kpn I y BamHI y el fragmento se ligó en el plásmido pUC 19 HA-K que se había digerido con Kpn I y BamH I. El plásmido se usó para transformar AG-1 de *E. coli* a amp^r. Se eligieron colonias individuales y se cultivaron en LB-amp. La identidad de plásmidos con el inserto correcto se determinó por mapeo de restricción. El plásmido resultante llamado pUC19 HA-K-GM-CSF se purificó usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

30

35 Ejemplo 12. Clonación de HA-K-GM-CSF en vector de expresión en levadura

Se usó PCR de pUC19 HA-K-GM-CSF para generar un fragmento de ADN que codifica HA-K-GM-CSF para la

clonación en un vector de expresión en levadura. El producto de PCR contiene sitios de clonación Eag I para inserción en marco en el vector de expresión en levadura.

Cebador en la dirección 5'

5' CTGAATTCCGGCCGGACACAATATGTATAGGC (SEC ID N°: 27)

5 Cebador en la dirección 3'

5' TAGGATCCCGGCCGTCATTTTTGGACTGGTTTTTGCACG (SEC ID N°: 28)

Las condiciones para PCR fueron:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

La PCR se realizó durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

10 Tras la PCR, el producto se sometió a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el gen HA-K-GM-CSF se extrajo del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado de ADN se digirió con Eag I y se ligó al vector de expresión en levadura ITK, que se había digerido con Eag I. El vector ITK se diseñó para (1) replicación en *E. coli* y (2) expresión de genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de la integración estable usando recombinación homóloga. El vector contiene:

1. Secuencias para la replicación del plásmido en *E. coli*
2. Promotor Gal de levadura para la expresión de genes heterólogos en medios que contienen galactosa.
- 15 3. PrePro - Secuencia de ADN sintética, optimizada para la secreción y escisión de la secuencia señal de genes distales en levadura.
4. Sitio Eag I único para la clonación de genes que van a expresarse.
5. Terminador alfa - Secuencia de ADN para la eficaz terminación de genes proximales.
- 20 6. Secuencia delta que permite la integración estable del plásmido por recombinación con secuencias delta endógenas en el cromosoma de levadura.
7. Gen de resistencia a antibióticos que permite la selección en *E. coli* con kanamicina y selección en levadura con G418.

25 Este plásmido se usó para transformar la cepa AG-1 de *E. coli*. Se seleccionaron transformantes por crecimiento sobre placas de LB que contenían 100 ug/ml de kanamicina. Las colonias individuales se cultivaron en medio LB que contenía kanamicina y los plásmidos se purificaron. Las digestiones de restricción determinaron la orientación de los insertos. El plásmido resultante ITK HA-K-GM-CSF se purificó usando un kit comprado de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

30 El plásmido purificado se linealizó con Mfe 1 y se usó para transformar la cepa de levadura WDHY131 de *Saccharomyces cerevisiae* usando acetato de litio (LiAc). Un cultivo de 10 ml de *S. cerevisiae* cultivado a saturación a 30 °C en medio YPD (por litro/ 20 g de bactotripton; 20 g de dextrosa; 10 g de extracto de levadura) se usó para inocular 100 ml de YPD. El cultivo se cultivó a 30 °C con agitación durante 3 horas. La levadura se recogió por centrifugación a 11.000 x g durante 2 minutos y se resuspendió en 25 ml de agua estéril. La levadura se centrifugó como antes y se resuspendió en 1,0 ml de acetato de litio 100 mM y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La levadura se sedimentó por centrifugación a 12.000 x g durante 15 segundos y el sobrenadante se eliminó. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de LiAc 100 mM. Se añadieron 50 ul de suspensión de células a tubos de microcentrífuga individuales y se centrifugaron como antes. El sobrenadante se eliminó. La mezcla de transformación añadida al sedimento de levadura consistió en: 240 ul de PEG (50% en peso/volumen); 36 ul de LiAc 1,0 M; 5 ul de ADN monocatenario (10 mg/ml) y 1 ug de ITK HA-K-GM-CSF linealizado en 75 ul de agua. La mezcla se agitó con vórtex para resuspender el sedimento de células y se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Entonces, las células se sometieron a choque a 42 °C durante 15 minutos, se centrifugaron para sedimentar células y se resuspendieron en 0,5 ml de YPD. La levadura se incubó en medio YPD durante 3 horas y se sembró en placas YPD que contenían 2 mg/ml de G418. Las placas se cultivaron a 30 °C durante 3 días hasta que aparecieron las colonias individuales. Para cribar para la expresión de HA-K-GM-CSF, las colonias individuales se cultivaron en 1 ml de medio YPD a 30 °C durante 2 días. Las células se centrifugaron a 8.000 x g durante 2 minutos y el medio YPD se eliminó y se sustituyó con 1 ml de medio YPG (por litro/ 20 g de bactotripton; 20 g de galactosa; 10 g de extracto de levadura) para la inducción del promotor gal. La levadura se cultivó en medio YPG durante 2 días. En ese momento se tomó una alícuota y las células se sedimentaron. El sobrenadante se probó para expresión de GM-CSF usando un kit de ELISA comprado de Endogen. El protocolo fue según el fabricante.

35

40

45

Se identificó una colonia que expresaba altos niveles de la proteína quimérica. Basándose en la curva patrón de GM-CSF soluble, el nivel de expresión es aproximadamente 2,0 mg/l de material soluble. No hay disminución en niveles de expresión en ausencia de G418.

Ejemplo 13. Purificación escalada de GM-CSF-K-HA

5 Para la purificación escalada de la proteína quimérica, la levadura se inoculó en 500 ml de YPD y se cultivó durante tres días a 30 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos y se transfirieron a un volumen igual de YPG durante tres días adicionales de crecimiento. Entonces, las células se sedimentaron por centrifugación a 12.000 x g durante 2 minutos y el sobrenadante se recogió. El material soluble se aplicó a una columna de inmunoafinidad de anticuerpo monoclonal anti-GM-CSF murino (Endogen) ligado a Sepharose 4B
10 activada con bromuro de cianógeno (Sigma). El acoplamiento del monoclonal a Sepharose se realizó según el fabricante. La eficiencia del acoplamiento se monitorizó usando DO₂₈₀ y la unión de GM-CSF a anticuerpo inmovilizado se probó usando material soluble comercialmente disponible.

Se aplicó material derivado de levadura soluble a la columna y se dejó circular por gravedad. La columna se lavó con: (a) 20 volúmenes de NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 7,4 (TN) (b) 5 volúmenes de Tris 50 mM a pH 8,0 (c) 20 volúmenes de TN. Entonces, el material unido se eluyó con 10 volúmenes de NaCl 0,15 M, Tris 25 mM a pH 2,5. El material eluido se neutralizó con 1/200 volumen de Tris 1,5 M a pH 8,8. El material purificado se concentró usando un dispositivo centrífugo Microsep 3K (Pall Gelman Laboratory). Los rendimientos de proteína quimérica por ELISA (Endogen) se determinaron según las instrucciones del fabricante.

GM-CSF-K-HA purificado

20 Se analizó GM-CSF-K-HA purificado por transferencia Western. Aproximadamente 1 ug de GM-K-HA por carril se sometió a electroforesis junto con GM-CSF soluble. Para transferencia Western, los geles se transfirieron a Protran BA83 (Schleicher y Schuell), se bloquearon con TBS (solución salina tamponada con Tris) que contenía 0,05% de Tween 20 y 2% de leche desnatada en polvo. La transferencia se incubó con anticuerpo primario (monoclonal de rata anti-GM-CSF murino, Endogen) a dilución 1:5000 en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. La transferencia se lavó con TBS-0,05% de Tween 20. Se incubó anticuerpo secundario, anti-IgG de rata conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma), a 1:10.000 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Ejemplo 14. Decoloración de células con GM-K-HA

30 Se usó GM-CSF-K-HA purificado para decolorar células de fibrosarcoma murino CMS-5. Las células CMS 5 se cultivaron en DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomomicina, se recogieron por tripsinación y se lavaron 3 veces con RPMI 1640 (Gibco). Las células se diluyeron a 1×10^6 /ml en RPMI 1640 y 0,9 ml se repartieron alícuotas en tubos siliconizados. Las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación y luego se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF. El anticuerpo primario, monoclonal de rata anti-GM-CSF murino, se incubó durante una hora a 4 °C. Las células se lavaron como antes, se trataron con anti-anticuerpo de rata marcado con FITC (Sigma) y se incubaron durante una hora a 4 °C. Después del lavado adicional, las células se analizaron por citometría de flujo, que confirmó la presencia de GM-CSF-K-HA sobre la superficie de las células tumorales.

Ejemplo 15. Cuantificación de GM-CSF-K-HA sobre la superficie celular de células CMS-5 después de la decoloración

40 Se recogieron células CMS-5 y se lavaron como se ha descrito anteriormente. 1×10^6 células en 1 ml de RPMI 1640 se incubaron con 1 ug de GM-K-HA purificado. Después de la incubación durante 15 min, 30 min, 1 hora o 2 horas a 4 °C, temperatura ambiente o 37 °C, las células se lavaron 3 veces con PBS que contenía 2% de SBF. El sedimento de células se lisó con 50 microlitros de PBS que contenía 0,15% de desoxicolato y el detergente se diluyó posteriormente mediante la adición de 200 microlitros de PBS. El material se diluyó sucesivamente con PBS y se probó por ELISA (Endogen). Basándose en la cantidad de GM-CSF detectada en los lisados celulares fue posible cuantificar el número promedio de moléculas de GM-CSF asociadas a cada célula. Por ejemplo, después de una incubación de 15 min a 4 °C, 58.700 moléculas estuvieron presentes por célula. Después de una incubación de 15 min a temperatura ambiente, 25.700 moléculas estuvieron presentes por célula. Después de una incubación de 15 min a 37 °C, 17.200 moléculas estuvieron presentes por célula.

Ejemplo 16. Inmunización eficaz con células tumorales mezcladas con polipéptidos de fusión de GM-CSF/hemaglutinina

50 Se cultivaron células de fibrosarcoma murino CMS-5 al 70% de confluencia en DMEM, 10% de SBF, penicilina-estreptomomicina, se recogieron por tripsinación y se lavaron 3 veces con RPMI 1640. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y entonces las células se resuspendieron a una concentración de 4×10^6 células/ml y alícuotas de 1 ml se dispensaron a tubos de microcentrífuga siliconizados. Las células se incubaron con 1 ug (microgramo) de GM-CSF-K-HA murino o 10 ng (nanogramos) de HA-K-GM-CSF murino por 10^6 células durante 3 horas a 37 °C. Entonces, las células se lavaron 3 veces con RPMI 1640 y se resuspendieron a 4×10^6 células/ml en RPMI 1640. Se tomó una alícuota de las células y la cantidad de GM-CSF asociado a células se midió por ELISA como se ha descrito anteriormente. Hubo aproximadamente 20.240 y 18.000 moléculas/célula en los

grupos de GM-CSF-K-HA y HA-K-GM-CSF, respectivamente. Las células para una vacuna de control, que va a administrarse sin una molécula de la invención (o cualquier otro inmunomodulador), se prepararon en paralelo.

5 Las células se irradiaron a 3500 rad de una fuente de ¹³⁷Cs. Ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad (que son singeneicos para CMS-5) se anestesiaron por inhalación de metofano y se vacunaron subcutáneamente en el pliegue inguinal izquierdo con 1×10^6 células en 0,25 ml. Cada ratón recibió células de solo un tipo de vacuna. Siete días después, las células CMS-5 no mutantes al 70% de confluencia se recogieron y se lavaron 3 veces en HBSS. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y las células se ajustaron a 4×10^6 /ml en HBSS. Entonces, los ratones previamente vacunados se inyectaron subcutáneamente detrás del cuello, bajo anestesia con metofano, con 2×10^6 células CMS-5 no mutantes vivas en 0,5 ml de HBSS. Los grupos que recibieron las vacunas de HA-K-GM-CSF y de control consistieron cada uno en 5 ratones, mientras que el grupo que recibió la vacuna de GM-CSF-K-HA consistió en 4 ratones debido a que 1 ratón no se despertó de la anestesia.

10 El desarrollo del tumor se evaluó diariamente por palpación e inspección visual. El observador se cegó a la vacuna recibida por cada conjunto de ratones para protegerse del favoritismo. Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ cuando los tumores se convirtieron en difíciles de manejar. Todos los ratones que habían recibido la vacuna de control desarrollaron tumores en el plazo de 18 días después de la exposición a células tumorales vivas. A diferencia, el 100% de los ratones que había recibido la vacuna de GM-CSF-K-HA y el 60% de los ratones que había recibido la vacuna de HA-K-GM-CSF siguieron sin tumor al final del experimento, 40 días después de la exposición. Así, la inmunización con una composición que comprende células tumorales y una molécula de la invención confiere supervivencia sin tumor significativamente más larga que la inmunización con una composición que comprende células tumorales, pero que no comprende una molécula de la invención.

Ejemplo 17. Clonación de GM-CSF-K-HA humano

25 pUC19 GM-CSF-K-HA humano (hGM-CSF-K-HA) se clona a partir de pUC19 GM-CSF-K-HA. pUC19 GM-CSF-K-HA se digiere con EcoRI y NgoM IV. EcoRI corta en el extremo 5' de la secuencia codificante de GM-CSF murino y NgoM IV corta en el extremo 3' de la molécula de GM-CSF murino. El plásmido resultante con la región codificante de GM-CSF murino eliminada se purifica después de la electroforesis mediante gel de agarosa usando un kit fabricado por Qiagen. El segmento codificante de GM-CSF humano se genera por PCR a partir de una biblioteca de ADNc humano comercialmente disponible (Clontech). La secuencia humana empieza en el aminoácido 18, el inicio de la proteína madura, es decir, que carece de la secuencia señal secretora. El extremo 3' se corresponde con el aminoácido 144, eliminando el codón de terminación endógeno.

30 Cebador de hGM-CSF en la dirección 5'

5' GCGAATTCCGGCCGGCACCCGCCCGCTCGCCCAGC (SEC ID N°: 29)

Cebador de hGM-CSF en la dirección 3'

5' TAGCCGGCCTCCTGGACTGGCTCCCAGCA (SEC ID N°: 30)

Las condiciones para PCR son:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

35 La PCR se realiza durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

Tras la PCR, el producto se somete a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el gen hGM-CSF se extrae del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN de hGM-CSF purificado se digiere con EcoRI y NgoM IV y se liga en el vector pUC 19 GM-CSF-K-HA murino que se ha digerido con EcoRI y NgoM IV para eliminar la secuencia de GM-CSF murino. El ADN se usa para transformar AG1 de *E. coli* y los transformantes se seleccionan sobre placas de LB-ampicilina. El ADN de plásmido de colonias individuales se aísla y se digiere con enzimas de restricción para identificar el clon que aloja un plásmido pUC19 hGM-CSF-K-HA.

40 El plásmido pUC19 hGM-CSF-K-HA se purifica según las instrucciones del fabricante usando un kit comprado de Qiagen. Se usa PCR de pUC19 hGM-CSF-K-HA para generar un fragmento de ADN que codifica hGM-CSF-K-HA para la clonación en un vector de expresión en levadura. El producto de PCR contiene sitios de clonación Eag I para la inserción en marco en el vector de expresión en levadura.

45 Cebador en la dirección 5'

5' GCGAATTCCGGCCGGCACCCGCCCGCTCGCCCAGC (SEC ID N°: 31)

Cebador en la dirección 3'

ES 2 441 724 T3

5' ATGGTACCCGGCCGTTATCATCTGGATTGAATGGACGG (SEC ID N°: 32)

Las condiciones para PCR son:	Desnaturalización	90 °C	un minuto
	Hibridación	60 °C	un minuto
	Extensión	72 °C	un minuto

La PCR se realiza durante 20 ciclos usando vent polimerasa.

Tras la PCR, el producto se somete a electroforesis mediante un gel de agarosa al 1,0% y el gen hGM-CSF-K-HA se extrae del gel usando un kit de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado de ADN se digiere con Eag I y se liga al vector de expresión en levadura ITK que se ha digerido con Eag I. El vector ITK se diseña para (1) replicación en *E. coli* y (2) expresión de genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* después de la integración estable usando recombinación homóloga. El vector contiene:

1. Secuencias para la replicación del plásmido en *E. coli*
- 10 2. Promotor Gal de levadura para la expresión de genes heterólogos en la levadura cultivada en medios que contienen galactosa.
3. PrePro - Secuencia de ADN sintética, optimizada para la secreción y escisión de la secuencia señal de genes distales en levadura.
4. Sitio Eag I único para la clonación de genes que van a expresarse.
- 15 5. Terminador alfa - Secuencia de ADN para la eficaz terminación de genes proximales.
6. Secuencia delta que permite la integración estable del plásmido por recombinación con secuencias delta endógenas en el cromosoma de levadura.
7. Gen de resistencia a antibióticos que permite la selección en *E. coli* con kanamicina y selección en levadura con G418.

20 Este plásmido se usa para transformar la cepa AG-1 de *E. coli*. Se seleccionaron transformantes por crecimiento sobre placas de LB que contienen 100 ug/ml de kanamicina. Las colonias individuales se cultivan en medio LB que contiene kanamicina y los plásmidos se purifican. Las digestiones de restricción determinan la orientación de los insertos. El plásmido resultante ITK hGM-CSF-K-HA se purifica usando un kit comprado de Qiagen según las instrucciones del fabricante.

25 El plásmido purificado se linealiza con Mfe 1 y se usa para transformar la cepa de levadura WDHY131 de *Saccharomyces cerevisiae* usando acetato de litio (LiAc). Un cultivo de 10 ml de *S. cerevisiae* cultivado a saturación a 30 °C en medio YPD (por litro/ 20 g de bacto triptona; 20 g de dextrosa; 10 g de extracto de levadura) se usa para inocular 100 ml de YPD. El cultivo se cultiva a 30° con agitación durante 3 horas. La levadura se recoge por centrifugación a 11.000 x g durante 2 minutos y se resuspende en 25 ml de agua estéril. La levadura se centrifuga como antes y se resuspende en 1,0 ml de acetato de litio 100 mM y se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La levadura se sedimenta por centrifugación a 12.000 x g durante 15 segundos y el sobrenadante se elimina. Las células se resuspenden en 0,5 ml de LiAc 100 mM. Se añaden 50 ul de suspensión de células a tubos de microcentrífuga individuales y se centrifugan como antes. El sobrenadante se elimina. La mezcla de transformación añadida al sedimento de levadura consiste en: 240 ul de PEG (50% en peso/volumen); 36 ul de LiAc 1,0 M; 5 ul de ADN monocatenario (10 mg/ml) y 1 ug de ITK hGM-CSF-K-HA linealizado en 75 ul de agua. La mezcla se agita con vórtex para resuspender el sedimento de células y se incuba a 30 °C durante 30 minutos. Entonces, las células se someten a choque a 42 °C durante 15 minutos, se centrifugan para sedimentarlas y se resuspenden en 0,5 ml de YPD. La levadura se incuba en medio YPD durante 3 horas y se dispone sobre placas YPD que contienen 2 mg/ml de G418. Las placas se cultivan a 30 °C durante 3 días hasta que aparecen las colonias individuales.

40 Para cribar para la expresión de hGM-CSF-K-HA, colonias individuales se cultivan en 1 ml de medio YPD a 30 °C durante 2 días. Las células se centrifugan a 8.000 x g durante 2 minutos y el medio YPD se elimina y se sustituye con 1 ml de medio YPG (por litro/ 20 g de bacto triptona; 20 g de galactosa; 10 g de extracto de levadura) para la inducción del promotor gal. La levadura se cultiva en medio YPG durante 2 días. Entonces se toma una alícuota y las células se sedimentan. El sobrenadante se prueba para expresión de hGM-CSF usando un kit de ELISA comprado de Endogen. El protocolo es según el fabricante.

45

Ejemplo 18. Reducción de metástasis en un modelo de ratón

Se recogieron células de melanoma murino B16F10 y se lavaron tres veces en PBS. Entonces, las células se suspendieron a 5×10^5 células viables/ml en PBS, determinándose la viabilidad tiñendo una alícuota de células con

5 azul de tripano. Se inyectaron 100 μ l de esta suspensión en las venas de la cola de ratones C57BL/6 hembra de 8-10 semanas de edad. En el día 1 o día 3 después de la exposición al tumor, los ratones se inmunizaron con 1×10^6 células B16F10 irradiadas subcutáneamente en el pliegue inguinal izquierdo. Los grupos (3 ratones cada uno) recibieron tanto células solas, células mezcladas con 1 μ g de GM-CSF murino recombinante soluble (Serologicals Corp.) como células mezcladas con 1 μ g de una molécula multifuncional de la invención que comprendía GM-CSF murino en el extremo N, un ligador flexible (Gly₄Ser)₂ y el dominio de HA1 de hemaglutinina A/PR/8/34 de la gripe en el extremo C. La última composición comprendió tanto molécula multifuncional libre como unida a célula.

10 Los ratones se sacrificaron en el día 12, se abrió la cavidad torácica con tijeras de disección y los pulmones se extirparon en bloque por sección transversal traqueal. Las metástasis se enumeraron con una lente manual. En los ratones inmunizados 1 día después de la exposición, el número promedio de metástasis/ratón fue del siguiente modo:

Células solas:	30,00
Células + GM-CSF:	14,33
Células + molécula multifuncional:	0,67

En los ratones inmunizados 3 días después de la exposición, el número promedio de metástasis/ratón fue del siguiente modo:

Células solas:	36,33
Células + GM-CSF:	10,33
Células + molécula multifuncional:	1,00

15 Así, la administración de la composición que comprende una molécula multifuncional de la invención pudo reducir eficazmente la metástasis y tratar la enfermedad.

Ejemplo 19. Protección mediada por GM-CSF-HA1 contra la exposición del tumor *in vivo*

20 Como un modelo de vacuna tumoral alogénea, ratones C57BL/6 (haplotipo b) se inmunizaron con células de melanoma K1735 derivadas de C3H (haplotipo k), seguido de exposición a células de melanoma B16F10 derivadas de C57BL/6. Las células K1735 se cultivaron al 70% de confluencia en DMEM con 10% de SBF y penicilina-estreptomomicina, se recogieron por tripsinación y se lavaron 3 veces con RPMI 1640. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y entonces las células se resuspendieron a una concentración de 4×10^6 células/ml para K1735. Entonces, alícuotas de un ml se dispensaron a tubos de microcentrifuga siliconizados. Las
25 células se incubaron con 1 μ g de mGM-CSF-HA1 (un polipéptido de fusión que consiste en GM-CSF murino en el extremo N, un ligador (Gly₄Ser)₂ y el dominio de HA1 de la gripe A/PR/8/34) por 10^6 células durante 2 horas a 4 °C. Se tomó una alícuota de las células para la medición de GM-CSF asociado a células por ELISA. GM-CSF asociado a células medio a lo largo de dos experimentos fue aproximadamente 60.000. Se prepararon células que no se mezclaron con ningún polipéptido y, en un experimento, células mezcladas con 1 μ g de GM-CSF soluble murino (Serologicals Corp.) en paralelo como vacunas de control.
30

Las células se irradiaron a 3500 rad de una fuente de ¹³⁷Cs. Ratones C57BL/6 hembra de 8 semanas de edad se anestesiaron por inhalación de metofano y se vacunaron subcutáneamente en el pliegue inguinal izquierdo con o 1×10^6 células en 0,25 ml de RPMI, junto con un total de 1 μ g de GM-CSF-HA1 (incluyendo polipéptido de fusión unido y libre). Cada ratón recibió células de solo un tipo de vacuna. Siete días después, células B16F10, según
35 corresponda, al 70% de confluencia se recogieron y se lavaron 3 veces en HBSS. La viabilidad se determinó por tinción con azul de tripano de una alícuota y las células se ajustaron en HBSS a 1×10^5 /ml. Los ratones previamente vacunados se expusieron entonces subcutáneamente detrás del cuello, bajo anestesia con metofano, a 0,5 ml de suspensión de células B16F10.

40 El desarrollo del tumor se evaluó diariamente por palpación e inspección visual. La "aparición" se definió como el primer día en el que una masa tumoral fue tanto palpable como visible. El observador se cegó a la vacuna recibida por cada conjunto de ratones para protegerse del favoritismo. Los ratones se sacrificaron por asfixia con CO₂ cuando los tumores se convirtieron en difíciles de manejar. Los experimentos se terminaron 70 días después de la exposición del tumor, como se había planeado de antemano.

45 En resultados reunidos de dos experimentos, 70 días después de la exposición, 7/10 ratones que se habían vacunaron con células mezcladas con polipéptido de fusión siguieron sin tumor. A diferencia, 10/10 ratones que se habían vacunado con células solas desarrollaron tumores, como los hicieron 4/5 ratones vacunados con células mezcladas con GM-CSF soluble murino.

Otras realizaciones

Los anteriores ejemplos demuestran experimentos realizados y contemplados por los presentes inventores en la preparación y en llevar a cabo la invención. Se cree que estos ejemplos incluyen una divulgación de técnicas que sirven tanto para notificar la materia de la práctica de la invención como para demostrar su utilidad.

5 **Apéndice I**

BC025704; BC025713; BC025722; BC025717; BC025695; BC025727; BC025691; AF474992; AF474991; AF474990; AF474989; AF474988; AF453877; U62556; AF449218; AJ437349; AJ011371; BC025294; BM875542; AY059419; AY059418; AY059417; AY059420; AC079385; AC078889; AC010168; U14188; U14187; U15637; AF262304; AF262303; AF262302; AF262301; AF262300; AF262299; AF247361; AF416619; AF416618; AJ303165; 10 NM_017451; NM_017450; NM_006340; AF350881; AF022044; AF034773; AF034772; AF034771; AF022047; AF022046; AF022045; U56255; AJ422056; AY028912; AY028911; AY028910; AY028909; AY028908; AY028907; AY028906; AH010677; AY028913; BM735809; BM735756; BM735711; AC007165; AF245699; BC024229; AJ417555; AJ417554; NM_003877; NM_017662; NM_016148; NM_017729; M13824; M12960; M13823; L12398; M86383; NM_012245; NM_006750; NM_130845; NM_002846; NM_002845; NM_002844; NM_002843; NM_002841; 15 NM_130440; NM_130393; NM_130392; NM_130391; NM_003682; NM_130476; NM_130475; NM_002840; NM_130474; NM_130473; NM_130472; NM_130471; NM_130470; NM_006504; NM_130435; AJ431177; NM_006474; NM_006794; NM_002842; NM_002839; BC024145; AF469756; AF469755; AF469754; AF416711; NM_023068; NM_004782; NM_130798; NM_003825; AF439409; NM_032211; AF411122; NM_130441; NM_030876; NM_032732; NM_030959; NM_018844; NM_002825; NM_016372; NM_014288; L43588; U77589; 20 AF410465; AF332759; AF332758; NM_003744; NM_003681; NM_080706; NM_080705; NM_080704; NM_018727; NM_080819; NM_080738; NM_080491; NM_012296; NM_032027; NM_057159; NM_001401; NM_007070; NM_053274; NM_003726; NM_033632; NM_018315; NM_021203; NM_002927; NM_020167; AF190052; NM_018965; NM_018643; NM_018647; NM_018695; NM_017636; NM_016559; NM_016382; NM_015986; NM_014815; NM_014053; NM_014478; NM_012470; NM_007357; NM_005162; NM_005501; NM_007053; 25 NM_006653; NM_005761; NM_005866; NM_005506; NM_004799; NM_004292; NM_004828; NM_004767; NM_004440; NM_003999; NM_003305; NM_003626; NM_003876; NM_003559; NM_003629; NM_003676; NM_002270; NM_002204; NM_001560; NM_000842; NM_001883; NM_001873; L29395; L08584; NM_015638; NM_054032; NM_054031; NM_054030; NM_052931; NM_032871; NM_032553; NM_025179; NM_021249; NM_014045; NM_080923; NM_080922; NM_080921; NM_130386; NM_030781; NM_002838; NM_130770; 30 BD010218; BD010217; BD010216; BD010215; BD010214; BD010125; BD010114; BD010057; BD010056; BD010055; BD010054; BD010053; BD010052; BD010051; BD010050; BD010049; BD010046; BD010035; BD010034; BD010028; BD010022; BD009263; BD009262; BD009261; BD009260; BD006753; E51301; E51300; E51299; E51298; E51297; E51296; E50838; E50837; E50836; E50835; E50834; E50833; BD003056; E55122; E55121; E55120; E55119; E55118; E55117; E49128; E49127; E49126; E49125; D21847; D21846; D21845; 35 D21844; D13083; D13085; D13088; D13087; D13082; D13086; D13084; D13073; D13079; D13069; D13078; D13072; D13076; D13071; D13074; D13070; D13077; D13075; D13081; D13080; D16584; D16586; D16585; NM_003268; NM_003265; NM_003264; NM_003263; NM_020350; AY081843; NM_016511; NM_016509; AL713657; AJ438313; AF390036; AF329495; AF329494; AF329493; AF329491; AF329489; AB060695; AJ276429; A136801; AL136652; AB012911; AY071862; NM_133169; NM_133168; NM_130771; AF426461; AF428134; 40 AF428133; AF428132; AF428131; AF428130; AF428129; AF428128; AF428127; AF428126; AF428125; AF242456; S57283; L14854; NM_024080; AY069961; U43901; NM_021044; AC078860; AC003683; AC007397; AC007784; AF451730; AF451729; AF451728; AF451727; A451726; AF451725; AF451724; AF451723; AF451722; AF451721; AF451720; AF451719; AF451718; AF449218; BC025704; BC025713; BC025722; BC025717; BC025695; BC025691; AF474992; AF474991; AF474989; AF474988; AF474987; AF453877; U62556; AJ011371; 45 AY059419; AY059418; AY059417; AY059420; AC079385; AC078889; AC010168; U14188; U14187; U15637; AF262304; AF262303; AF262302; AF262301; AF262300; AF262299; AF247361; AF247360; AF247359; AF416619; AF416618; AJ303165; AF350881; AF022044; AF034773; AF034772; AF034771; AF022047; AF022046; AF022045; U56255; AJ422056; AY028912; AY028911; AY028910; AY028909; AY028908; AY028907; AY028906; AH010677; AY028913; BM735809; BM735756; BM735711; AC007165; AF245699; BC024229; AJ417555; AJ417554; 50 NM_003877; NM_017662; NM_133181; M13823; L12398; M86383; NG_000019; NM_012245; NM_006750; NM_130845; NM_002846; NM_002845; NM_002844; NM_002843; NM_002841; NM_130440; NM_130393; NM_130392; NM_130391; NM_003682; NM_130476; NM_130475; NM_002840; NM_130474; NM_130473; NM_130472; NM_130471; NM_130470; NM_006504; NM_130435; AJ431177; NM_006474; NM_006794; NM_002842; NM_002839; BC024145; AF469756; AF469755; AF469754; BM565570; AF416711; NM_023068; 55 NM_004782; NM_130798; NM_003825; AF439409; NM_032211; AF411122; NM_130441; NM_030876; NM_032732; NM_030959; NM_018842; NM_018844; NM_002825; NM_016372; NM_014288; L43588; AB050954; U77589; AF410465; AF332759; AF332758; NM_0003744; NM_003681; NM_080706; NM_080705; NM_080704; NM_018727; NM_080819; NM_080738; NM_080491; NM_012296; NM_032027; NM_057159; NM_001401; NM_007070; NM_053274; NM_003726; NM_033632; NM_018315; NM_021203; NM_002927; NM_020167; 60 NM_020149; AF190052; NM_018965; NM_018643; NM_018647; NM_018695; NM_017636; NM_016559; NM_016382; NM_015986; NM_014815; NM_014053; NM_014478; NM_012470; NM_007357; NM_007324; NM_007323; NM_005162; NM_005501; NM_007053; NM_006254; NM_005761; NM_005866; NM_005506; NM_004799; NM_004292; NM_004828; NM_004767; NM_004440; NM_003999; NM_003904; NM_003305;

ES 2 441 724 T3

NM_003804; NM_003626; NM_003876; NM_003559; NM_003629; NM_003676; NM_002270; NM_002204;
 NM_001560; NM_000842; NM_001883; NM_001873; L29395; L08584; NM_015638; NM_058167; NM_054032;
 NM_054031; NM_054030; NM_052931; NM_032871; NM_032553; NM_025179; NM_024419; NM_021249;
 NM_014045; NM_080923; NM_080922; NM_080921; NM_130386; NM_030781; NM_002838; NM_130770;
 5 BD010218; BD010217; BD010216; BD010215; BD010214; BD010125; BD010114; BD010057; BD010056;
 BD010055; BD010054; BD010053; BD010052; BD010051; BD010050; BD010049; BD010046; BD010035;
 BD010034; BD010028; BD010022; BD009263; BD009262; BD009261; BD009260; BD006753; E51301; E51300;
 E51299; E51298; E51297; E51296; E50838; E50837; E50836; E50835; E50834; E50833; BD003056; E55122;
 E55121; E55120; E55119; E55118; E55117; E49128; E49127; E49126; E49125; E49124; E49123; E58499; E58495;
 10 E58494; E58488; E58485; E58484; E58479; E43451; E43450; E41270; E41269; E41268; E40003; E40000; E39999;
 E39824; E39817; E39816; E39815; E34464; E33807; E33806; E63757; E63756; E63754; E49275; E44151; E44032;
 AX350990; AX350988; AX350984; AX350982; AX350981; AX350979; AX350975; AX350973; AX350969;
 AX350967; NM_005608; XM_012097; XM_090173; XM_055369; XM_041961; XM_040037; XM_045532;
 XM_091465; XM_036784; XM_036728; XM_084025; XM_009107; XM_027883; XM_027904; XM_049229;
 15 XM_040709; XM_003091; XM_010533; NT_006318; XM_039145; XM_039151; XM_007392; XM_007315;
 NT_024675; XM_051711; XM_007337; XM_096782; XM_055898; XM_018505; XM_096288; XM_096154;
 XM_015620; XM_048563; XM_086754; XM_056242; XM_097415; XM_044314; XM_092068; XM_084042;
 XM_012893; XM_103288; XM_046103; XM_047633; XM_030637; XM_086017; XM_029455; XM_085976;
 XM_084028; XM_097304; XM_050582; XM_041258; XM_050236; XM_048346; XM_044591; XM_085864;
 20 XM_044320; XM_012671; XM_085745; XM_008646; XM_008509; XM_030851; XM_048233; NT_010280;
 XM_039208; XM_030709; XM_085103; XM_040854; XM_007275; XM_083897; X_062656; XM_084785;
 XM_043322; XM_090117; XM_090109; XM_035095; XM_084690; XM_012064; XM_031348 XM_089965;
 NT_030791; XM_006549; XM_054215; XM_038024; XM_049296; XM_005781; XM_011904; XM_005969;
 XM_089569; XM_005830; XM_005747; XM_043613; XM_028830; XM_095961; XM_096286; XM_095815;
 25 XM_095814; XM_011695; XM_088035; XM_004696; XM_096245; XM_084200; XM_084190; XM_004341;
 XM_084185; XM_049570; XM_084176; NT_029289; XR_000069; NT_025716; XM_094306; XM_096226;
 XM_031131; XM_011222; XM_003519; XM_038446; XM_084160; XM_011169; XM_044120; NT_030654;
 NT_030650; XM_011173; NT_029955; NT_025693; NM_019841; NT_030778; NT_010591; NT_030889;
 XM_066104; XM_056414; XM_053166; XM_008489; XM_044091; NT_010258; XM_038336; XM_027181;
 30 XM_047362; XM_006372 ; XM_004893; XM_004559; XM_004237; XM_051214; XM_059645; XM_044493;
 XM_048562; XM_040307; XM_046949; XM_050937; XM_058224; XM_059877; XM_030074; XM_036899;
 XM_040292; XM_003913; XM_052621; XM_011186; XM_037260; XM_068231; XM_003896; XM_003883;
 XM_003423; XM_050674; XM_016537; XM_050512; XM_011248; XM_057299; XM_042825; XM_039993;
 XM_028642; XM_057337; XM_006447; XM_057984; XM_057452; X_051505; XM_027651; XM_028141;
 35 XM_004872; XM_057372; XM_056391; XM_054949; XM_009219; XM_057188; X_033762; XM_037256;
 XM_007662; XM_011327; XM_034331; XM_002212; XM_003736; XM_038350; XM_003789; XM_054659;
 XM_054658; XM_006275; XM_012695; XM_045812; XM_033995; XM_036978; XM_015355; XM_006738;
 XM_049255; XM_008930; NT_029418; XM_054004; XM_046588; XM_032592; XM_054157; XM_042907;
 XM_033031; XM_003708; XM_008189; XM_033305; XM_004350; XM_004285; XM_042636; XM_050142;
 40 XM_037826; XM_036497; XM_036891; XM_007986; XM_047456; XM_030214; XM_049959; XM_048049;
 XM_046488; XM_040635; XM_018451; XM_008432; XM_047339; XM_006349; XM_046182; XM_006312;
 XM_012936; XM_040842; XM_045103; XM_040699; XM_040922; XM_028854; XM_028783; XM_050577;
 XM_045929; XM_006929; XM_030897; XM_037563; XM_045549; XM_045706; XM_013100; XM_012862;
 XM_035037; XM_050707; XM_036573; XM_012843; XM_006789; XM_034808; XM_006747; XM_015921;
 45 XM_009008; XM_028274; XM_007123; XM_049518; XM_049496; XM_007577; XM_006636; XM_044309;
 XM_004134; XM_033838 XM_031082; XM_028205; XM_051710; XM_048918; XM_045352; XM_049463;
 XM_033240; XM_046720; XM_050434; XM_035832; XM_034142; XM_030066; XM_007383; XM_004117;
 XM_036123; XM_011817; XM_044653; XM_033529; XM_011916; XM_005486; XM_042740; XM_045386;
 XM_004002; XM_034451; XM_029284; XM_052171; XM_042695; XM_041933; XM_032738; XM_032682;
 50 XM_017228; XM_008538; XM_007046; XM_007751; XM_007719; XM_010296; XM_006950; XM_008206;
 XM_013114; XM_015989; XM_006934; XM_012441; XM_008193; XM_009108; XM_015505; XM_006145;
 XM_009803; XM_004030; XM_011703; XM_003986; XM_004253; XM_006233; XM_005384; XM_004988;
 XM_011364; XM_009612; XM_003417; XM_007817; XM_012949; XM_009594; XM_008512; XM_006931;
 XM_006933; XM_004438; XM_003692; XM_010228; XM_009082; XM_006296; NT_009784; XM_003386;
 55 NT_024131; XM_009373; XM_008520; XM_009140; XM_008279; XM_010321; XM_004808; XM_004807;
 XM_011092; XM_003324; XM_011068; XM_011064; XM_003207; XM_036436; XM_031246; XM_003226;
 NT_005824; XM_093629; NT_005564; XM_010943; XM_052730; XM_032666; XM_002686; XM_002596;
 XM_087110; XM_087047; XM_086954; XM_029434; XM_089355; XM_086483; XM_046751; XM_001821;
 XM_002205; XM_033690; XM_001795; XM_058179; XM_086356; XM_001499; NT_031737; XM_010608;
 60 XM_089029; XM_089028; XM_089016; XM_001289; XM_049849; XM_001667; XM_086285; XM_016748;
 XM_088942; XM_086242; XM_086232; XM_042739; XM_002008; XM_052013; XM_001320; NT_030585;
 XM_084053; XM_039685; XM_001687; XM_002700; XM_002673; XM_001924; XM_001744; XM_054837;
 XM_037011; NT_022773; XM_051522; NT_029249; XM_050043; XM_001857; XM_001630; XM_058183;
 XM_003177; XM_001778; XM_039118; NT_005791; NT_029941; XM_056760; XM_010871; XM_055737;
 65 XM_043563; XM_001466; XM_002888; XM_049427; XM_047502; XM_041048; XM_052155; XM_002926;
 XM_030397; XM_040605; XM_003199; XM_041399; XM_039011; XM_033709; XM_033469; XM_017782;

XM_002475; XM_051470; XM_001542; XM_052382; XM_032349; XM_002792; XM_045070; XM_045067;
 XM_002685; XM_002624; XM_001907; XM_001543; NM_016113; NM_002837; NM_017625; NM_000651;
 NM_000573; BC022501; BC022447; BC022317; BC022304; BC022496; BC022511; BC022502; BC022449;
 BC022295; BC022279; AH011463; AF453828; AY072912; AY072911; AY072910; NM_020399; NM_017935;
 5 NM_002438; AF321913; AF321912; A321911; AF321910; NM_080841; NM_080840; NM_002836; NM_023915;
 NM_003029; NM_018490; NM_006065; NM_003667; NM_080816; NM_018556; NM_080914; NM_080913;
 NM_080912; NM_001181; NM_001671; NM_014978; NM_021625; NM_020960; NM_021634; NM_016179;
 NM_004621; NM_003304; NM_016235; AF024642; NM_020777; NM_052918; AF391164; AF391163; AF391162;
 10 AJ421783; AF410902; AF410901; AF410900; AF410899; AF410898; AY071830; AF421362; AF421361; AF421360;
 AF421359; AF421358; AF359246; NM_022349; NM_006055; NM_005716; NM_003307; NM_003807; NM_002984;
 NM_021181; BC021892; AF459285; BC021553; BC021195; BC020752; BC020614; BC021104; BC020805;
 BC020742; BC020815; BC020768; BC020739; BC020678; BC020669; BC020968; BC019610; BC020079;
 NM_001364; NM_080744; AB063170; NM_022760; NM_032554; AB054004; NM_000668; NM_018697;
 NM_016610; NM_015833; NM_007184; NM_000139; NM_080681; NM_080680; NM_080679; NM_006115;
 15 NM_020526; NM_080818; NM_080817; AF400075; NM_024021; AB066218; AB066217; NM_021950; NM_012323;
 AJ298292; AB070621; AB070620; AB050774; AB048946; NM_030760; NM_032556; AF459634; AF459633;
 AY046529; AY046528; AX338549; NM_001745; NM_001128; NM_080545; NM_003917; AF459027; AY069943;
 AY063126; AY063125; AF395264; AF395263; AF395262; AF395261; AF395260; AF395259; AF395258; AF395257;
 AF395256; AF395255; AF395254; AF395253; AF395252; AF395251; AF395250; AF395249; AF395248; AF395247;
 20 AF395246; AF395245; AF395244; AF395243; AF395242; AF395241; AF395240; AF395239; AF395238; AF395237;
 AF395236; A395235; AF395234; AF395233; AF395232; AF395231; A395230; AF395229; AF395228; AF395227;
 AF395226; AF395225; AF395224; AF395223; AF395222; AF395221; AF395220; AF395219; AF395218; AF395217;
 AF395216; AF395215; AF395214; AF395213; AF395212; AF395211; AF395210; AF258342; AJ278982; AJ278981;
 AJ278980; AJ278979; NM_014555; AF200627; AF257789; NM_002335; Y00508; AF457599; AF457598; AF457597;
 25 AJ312755; AF331842; AF331841; AF331840; AF284756; AF328684; AY029413; AF126470; AF435925; G67431;
 AF260136; AF260135; AF260134; NM_015891; L12397; NM_019888; NM_000795; NM_016574; AY070269;
 NM_052945; NM_054026; NM_013354; NM_004444; NM_004443; NM_004442; NM_017449; BC019271;
 NM_080387; NM_007200; AF373878; AF373877; AF373876; AY065844; AY062295; NM_078474; NM_025141;
 NM_078473; NM_020749; NM_002088; AY064474; AY036093; AF369653; AF369652; AF369651; NM_001239;
 30 NM_014286; NM_006650; NM_006651; AF416558; BC018926; BC018778; NM_004625; L78805; NM_003602;
 NM_000801; NM_054014; AF411044; NM_003728; NM_605633; AJ308539; AJ308538; AJ308537; AJ308536;
 AJ308535; AJ308534; AJ308533; AJ308532; NM_014459; NM_032961; NM_020815; NM_032966; AF011513;
 AF011512; AF011511; AF011510; AF011509; AF011508; AF011507; AF011506; AF011505; AF011504; AF011503;
 AF011502; AF011501; AF011500; U77732; NM_033519; NM_032192; NM_032152; NM_032142; NM_004801;
 35 NM_031936; NM_030901; NM_024681; NM_022571; NM_022065; NM_020806; NM_021258; NM_020400;
 NM_000888; NM_018113; NM_018423; AF257182; NM_016442; NM_015364; NM_014380; NM_013308;
 NM_013333; NM_007369; NM_002673; NM_007115; NM_007223; NM_006748; NM_006681; NM_006068;
 NM_006018; NM_006098; NM_005879; NM_005843; NM_005505; NM_005795; NM_005400; NM_004488;
 NM_004122; NM_004438; NM_004198; NM_004054; NM_003955; NM_003693; NM_003625; NM_000286;
 40 NM_002563; NM_000913; NM_002333; NM_001957; L34726; L34725; L34724; L34723; L34722; L34721; L34719;
 L34737; L34736; L34735; L34733; L34732; L34731; L34730; L34728; L34727; L34703; L34702; L34701; L34700;
 L34699; L34698; L34695; L34694; L34738; L34718; L34717; L34716; L34715; L34714; L34713; L34712; L34711;
 L34710; L34709; L34708; L34707; L34706; L34705; L34704; L29037; L29038; L29036; L29035; AF106913;
 AB055881; AJ417149; AJ417148; NM_054021; NM_052939; NM_052938; NM_003823; NM_006470; NM_031918;
 45 NM_023945; NM_018485; NM_016562; NM_006138; AF447176; AF447175; AF447174; AF447173; AF447171;
 AF447170; AF447167; AF447164; AF447162; AF447158; AF447157; AH011239; AF374231; AY013309; AY013308;
 AY013307; AY013306; AB062787; NM_003392; AJ421518; NM_053049; AF430697; AF430696; AF430695;
 AF430694; AF430693; AF430692; AF430691; AF430690; AF430689; AF430688; AF430687; AF430686; AF430685;
 AF430684; AF430683; AF430682; AF430681; AF430680; AF430679; AF430678; AF430677; AF430676; AF430675;
 50 AF430674; AF430673; AF430672; AF430671; AF430670; AF430669; AF430668; AF430667; AF430666; AF430665;
 AF430664; AF430663; AF430662; AF430661; AF430660; AF430659; AF430658; AF430657; AF430656; AF430655;
 AF430654; AF430653; AF430652; AF430651; AF430650; AF430649; AF430648; AF430647; AF411117; AF411116;
 AF411115; AF411114; AF411113; AF411112; AF411111; AF411110; AF411109; AF411107; AF406692;
 NM_019035; AF214012; NM_030943; NM_023922; NM_023921; NM_023920; NM_023919; NM_023918;
 55 NM_023917; AF206696; AF230377; BC018284; BC018130; BC017898; BC017865; BC017852; BC017784;
 BC017773; BC017730; AJ252246; AJ249210; AJ249209; AJ249208; AJ415410; AJ415291; AJ414840; NM_000623;
 AJ347709; AF356518; NM_021201; NM_015344; AF411850; AF325460; AF325459; AF293357; AF283988;
 AF283987; AF283986; AF283985; AF283984; NM_057170; NM_057169; AJ417151; AJ417150; NM_014776;
 AJ239326; NM_000675; AF035374; AF282269; AF437510; AX286800; AX286799; AB005145; SEG_HUMIL3RA;
 60 L344720; L34734; L34729; D49412; D49410; D49408; D49409; D49407; D49406; D49404; D49403; D49402;
 D49401; D49411; D49405; SEG_HUMGRAS; D26625; D26624; D26623; D26622; D26621; D26628; D26627;
 D26626; D26620; D26619; D26618; D26617; D26616; AF324499; AF308814; AF238488; AF238487; AF220494;
 AF220493; AF209507; AF403014; AF403012; AY011601; AY011231; AF400602; AF400601; AF400600; AF400599;
 AF400598; AF400597; AF400596; AF400595; AF162669; NM_004895; AF409103; NM_033181; AF373846;
 65 AF361108; NM_005755; AF369794; AF376725; AF352324; AJ249131; S73474; S73490; S69142; S67401; S62797;
 AF310685; NM_057160; NM_057091; NM_057090; NM_003976; NM_053032; NM_053031; NM_053030;

NM_053029; NM_053028; NM_053027; NM_053026; NM_053025; NM_005965; AF106202; AY033942; AF369708;
 AJ276204; AJ276203; AJ276202; AJ276201; AJ276200; AJ276199; AJ276198; AJ276197; AJ276196; AJ276195;
 AJ276194; AJ276193; AJ276192; AJ276191; AJ276190; AJ276189; AJ276188; AJ276187; AJ276186; AJ276185;
 AJ276184; AJ276183; NM_005086; NM_018153; NM_053034; NM_005929; NM_033316; AF361473; NM_032208;
 5 NM_007346; BC017412; AF435588; AF421380; AF291815; AF117899; AF054013; AF013250; AF013249;
 AF326353; BC017065; BC016938; BC016860; BC016692; AY026949; AF285092; D78579; D38044; NM_053278;
 NM_030916; AF403479; NM_053036; BC016004; BC013827; BC001590; BC001492; BC015768; BC015731;
 BC015542; BC015195; BC014972; BC014962; BC014960; BC013816; BC013780; NM_032551; AF329490;
 AF329488; NM_000798; NM_000794; NM_000796; NM_033663; NM_033660; NM_033659; NM_033658;
 10 AJ298918; AJ298917; AJ298916; AF325925; AF325924; NM_014879; NM_000797; NM_052962; NM_052932;
 NM_052887; NM_018835; BC016141; AF177765; U11813; BC009540; AJ313162; AJ313161; AY048757; AJ313161;
 AY048757; NM_012068; AF055084; AJ414821; AY056048; AY056047; AY052498; AY052497; AY052496;
 AF267245; AF267244; NM_033637; NM_033050; NM_023914; NM_020402; NM_020370; NM_012301; AF208541;
 NM_005756; NM_003939; AH003597; L77730; L77729; AF000381; AY054974; AF421855; AF359241; NM_022148;
 15 AF179770; AF179767; AF179766; AF179761; AF179760; AF179759; D86962; D13626; AF026770; AY026769;
 AJ344142; AY029770; NM_002821; AF303576; AB032427; AY008280; U40271; NM_000575; NM_014312;
 AB032738; AB032737; AB032736; AB032735; AB032734; AB032733; AB032732; AB032731; AB032730;
 AB032729; AB032728; AB030952; AB030951; AB030950; AB030949; AB023892; AB023891; AB023890;
 AB023889; AB023888; AB023887; AH008153; AF146427; AF146426; NM_006691; Z99761; Z99760; NM_001250;
 20 NM_000406; Z99995 G16069; G16077; G16076; G16075; G16074; G16073; G16072; G16071; G16070; G16068;
 G16067; G16066; G16065; G16064; L11238; AF406652; NM_022059; NM_030956; NM_033358; NM_033357;
 NM_033356; NM_033355; NM_001228; NM_000024; NM_000683; NM_000682; NM_000681; NM_006179; L26458;
 L26457; L26456; L26455; L26454; L26453; L26452; L26451; AH009839; AJ301610; AJ301609; AJ301608;
 AF196774; AF196773; AF196772; AF252867; AF196771; AF196770; AF196769; AF196768; AF399937;
 25 NM_032405; NM_032404; NM_032401; NM_024022; AY046418; AF069333; AY029541; AF117819; NM_004624;
 AY042216; AY042215; AY042214; AY042213; Y11395; BC014108; AF306329; AF306328; AF306327; AF306326;
 AF306325; AH011061; AJ316282; AJ316281; AJ316280; NM_001954; NM_013994; NM_013993; AF325356;
 AF349574; NM_014395; AY043466; AY043465; AY043464; AJ344350; AJ344349; AJ344348; NM_033135;
 NM_025208; NM_033346; NM_001204; NM_003933; NM_002006; NM_000647; NM_004631; NM_033300;
 30 NM_017522; NM_033337; NM_001234; NM_002609; NM_006206; NM_000679; AY026771; 42: NM_000648;
 AB041403; NM_015722; AY044429; AJ306388; AJ277141; NM_033199; AB052684; AF227732; NM_005849;
 AF317654; AF399637; AF399636; AF399635; AF399634; AF399633; AF399632; AF399631; AF399630; AF399629;
 AF399628; AF399627; AF399626; AF399625; AF399624; AF399623; AF399622; AF399621; AF399620; AF399619;
 AF399618; AF399617; A399616; AF399615; AF399614; AF399613; AF399612; AF399611; AF399610; AF399609;
 35 AF399608; AF399607; AF399606; AF399605; AF399604; AF399603; AF399602; AF399601; AF399600; AF399599;
 AF399598; AF399597; AF399596; AF399595; AF399594; AF399593; AF399592; AF399591; AF399590; AF399589;
 AF399588; AF399587; AF399586; AF399585; AF399584; AF399583; AF399582; AF399581; AF399580; AF399579;
 AF399578; AF399577; AF399576; AF399575; AF399574; AF399573; AF399572; AF399571; AF399570; AF399569;
 AF399568; AF399567; AF399566; AF399565; AF399564; AF399563; AF399562; AF399561; AF399560; AF399559;
 40 AF399558; AF399557; AF399556; AF399555; AF399554; AF399553; AF399552; AF399551; AF399550; AF399549;
 AF399548; AF399547; AF399546; AF399545; AF399544; AF399543; AF399542; AF399541; AF399540; AF399539;
 AF399538; AF399537; AF399536; AF399535; AF399534; AF399533; AF399532; AF399531; AF399530; AF399529;
 AF399528; AF399527; AF399526; AF399525; AF399524; AF399523; AF399522; AF399521; AF399520; AF399519;
 AF399518; AF399517; AF399516; AF399515; AF399514; AF399513; AF399512; AF399511; AF399510; AF399509;
 45 A399508; AF399507; AF399506; AF399505; AF399504; AF399503; AF244813; AF169650; AF330055; AF330053;
 AF402318 AF397453; AF397452; AF400441; NM_020535; AP000511; L20295; AY040568; AY040567; AY040566;
 AX193708; AX193705; AX193702; AX193682; AX193679; NM_005675; NM_016083; NM_016205; AF159056;
 NM_006207; NM_004986; NM_001840; NM_033223; AY008283; NM_015906; NM_033020; AH006431; AF053495;
 AF053494; AF053493; AF053492; AF053491; AF053490; AF053489; AF053488; AF053487; AF344654; AF179680;
 50 AJ296652; NM_006707; NM_002009; AF190501; AF190500; NM_016543; NM_014385; AC005153; AJ309020;
 AJ243297; X57019; AF166361; AF166360; AF166359; AF165906; AF165905; AF165904; AF165903; AF165902;
 AF165901; AH009803; AF167332; AF166375; AF166374; AF166373; AF166372; AF166371; AF166370; AF166369;
 AF166368; AF166367; AF166366; AF166365; AF166364; AF166363; AF166362; AH009704; AF272389; BC011847;
 BC011787; AF353942; AF343725; AJ272063; AF133266; NM_033130; NM_033180; NM_033179; AF380193;
 55 AF380192; AF380189; AF380185; AF313468; NM_007096; NM_001833; NM_005292; NM_012276; AJ299451;
 AY033606; AF190696; NM_018558; NM_014452; AF320560; NM_007368; NM_016109; NM_006667; NM_006320;
 AF319553; AF395806; AF388194; AF388193; AF334818; NM_022788; NM_016523; NM_002558; AF391809;
 NM_016930; NM_032957; NM_032945; NM_015647; NM_005409; NM_001305; NM_004346; NM_032991;
 NM_033057; NM_020137; NM_032503; AF260738; AF326275; NM_016434; NM_013314; NM_005817;
 60 NM_003110; NM_002704; AF064083; BC010641; BC010574; BC010536; BC010423; BC010418; NM_020168;
 BC010140; BC010054; BC009974; BC009960; BC009877; BC009861; BC009748; BC009391; BC009237;
 BC008982; BC008867; BC008786; BC008770; BC008734; BC008716; BC008406; NM_032571; AF345568;
 AF345567; AF345566; AF345565; NM_013447; BC007720; BC007713; BC007566; BC007408; BC006196;
 BC005912; BC005818; BC005391; BC005333; BC005315; BC005268; BC004555; BC004553; BC004545;
 65 BC004899; BC004348; BC003684; BC003624; BC003187; BC003142; BC003110; BC003091; BC000181;
 BC0003005; BC002996; BC002947; BC002819; BC002794; BC002793; BC002788; BC002635; BC002537;

ES 2 441 724 T3

BC002464; BC002443; BC002354; BC001379; BC001281; BC001188; BC001110; BC000740; BC000571;
 BC000548; BC000513; BC000254; AF037351; BC009277; AF369786; U35877; U35876; NM_005656; NM_004167;
 NM_032965; NM_032964; AJ312373; AJ312372; AJ307885; NM_001987; NM_020403; NM_022843; NM_020164;
 5 AF361107; AF361106; AF284768; AF343090; AF286696; AF279673; AF279611; NM_005111; NM_000592;
 NM_016557; NM_006850; NM_000029; AF385591; AF385590; AF385589; AF385588; AF385587; AF385585;
 AF385584; AF361943; NM_031282; NM_031281; NM_020404; AF338733; AF338732; AJ272324; AF281043;
 NM_024298; AB051580; NM_006134; NM_015927; NM_000956; AF019381; AB043702; AF384819; AF343666;
 AF343665; AF343664; AF343663; AF343662; AF343661; AF343660; AF343659; AF321237; NM_005567;
 AF351620; AF366519; AB063174; AF238470; AF238469; AF238468; AE000662; AE000661; AE000660; AE000659;
 10 AE000658; AF364129; AF364128; AF261083; AF243129; AF243128; AF243127; AF243126; AF243125; AF243124;
 AF243123; AF243122; AF243121; AF243120; AF243119; AF243118; AF243117; AF243116; AF243115; AF243114;
 AF243113; AF243112; AF243111; AF243110; AF243109; AF243108; AF243107; AF243106; AF243105; AF243104;
 AF243103; AF243102; AF243101; AF243100; AF243099; AF243098; AF243097; AF243096; AF243095; AF243094;
 AF243093; AF243092; AF243091; AF243090; AF243089; AF243088; AF243087; AF243086; AF243085; AF243084;
 15 AF243083; AF243082; AF243081; AH010855 AY029596; AF233349; AF208690; AF208689; AF208688; AF208687;
 AF208686; AF208685; AF208684; AF208683; AB052639; AF366364; AF260728; AJ308526; AJ308525; AF165124;
 AF353733; AF236083; AF375468; AF374726; AF378542; AB051065; AF347063; AJ278250; AF297616; AJ271068;
 AJ271067; AJ271066; X91852; NM_032565; AY029539; NM_006986; AF351784; AF336376; AH010778;
 AH010779; AF310234; AF310233; AB060151; AF239764; AF199235; AF054176; AF369213; AF369212; AF369211;
 20 AF274714; NM_005959; NM_005958; AF366903; NM_002226; NM_009585; NM_032049; NM_031850;
 NM_004835; NM_000685; NM_003965; AJ298334; NM_000323; NM_020975; NM_020630; NM_020629;
 NM_002342; AY032736; AF322014; AF283321; AF283320; AH010745; NM_017934; AF203386; AF202305;
 AF169225; AF063657; AF022049; AF022048; AF361880; AF209923; AF207989; AB018076; SEG_AB010092S;
 NM_018980; NM_016945; AB018075; AB010092; AF130867; AF363791; AF363452; AY029486; AF224497;
 25 AF224496; AH010691; AF224495; AF251120; AF251119; AF251118; AF103013; AF103012; AF103011; AF103010;
 AF353183; AF353182; AF01411,2; AJ293654; AJ293653 ; AJ293652; AJ293651; AJ293650; AJ293649; AJ293648;
 AJ293647; AF329449; AF276893; AY029324; AF307337; Z75190; NM_004523; NM_006646; NM_030667;
 NM_002848; NM_006990; AF250309; AY029180; AF346711; AF346710; AF346709; AH010608; AF251059;
 AF251055; NM_030905; NM_012377; AB043703; AB051851; AB051850; AF349939; AF346629; NM_012373;
 30 AF056979; NM_017506; AF222689; NM_005137; AC002533; AF263617; AF262974; AF262973; AF262972;
 AF262971; AF262970; AF262969; AF262968; AF262967; AF262966; AF262965; AF348491; AF295368; AF237763;
 AF237762; NM_004248; AC000099; NM_030784; NM_030774; NM_030764; AJ249921; AF050737; NM_004987;
 AF348078; AJ276125; AF246999; AF246998; AF263450; AF148807; AH010591; Y18388; NM_002183; AF142570;
 NM_006140; NM_002186; AF296673; AF284095; AF279689; NM_000861; NM_001514; NM_022845; AF213460;
 35 AF213459; NM_019599; NM_017579; AJ306481; AJ306454; NM_024317; NM_020070; NM_002383; AJ306486;
 AJ306485; AJ306484; AJ306483; AJ306482; AJ306459; AJ306458; AJ306457; AJ306456; AJ306455; AJ291675;
 AJ291674; AJ291673; AF245704; AF245703; AF245702; NM_016944; NM_016943; AF307776; AB026043;
 AB013104; AB013103; AB013102; NM_003789; NM_025218; NM_025217; NM_024518; AB052103; AB038518;
 NM_021708; NM_021706; NM_002287; AB038237; S82756; S82754; NM_024318; AF178982; NM_021956;
 40 NM_018724; AJ295846; AF310249; AF321815; AL136818; AF285440; AF285439; AF285438; AF285437;
 AF285436; AF285435; AF285434; AF285433; AF285432; AF285431; AJ245872; AJ245871; AL050262; AF308820;
 NM_014432; NM_004967; AF348323; S79217; S78723; S78505; S77555; NM_024012; NM_021904; NM_021903;
 NM_001470; NM_007329; S71404; NM_023031; NM_023030; NM_023028; NM_022976; NM_022975; NM_022974;
 NM_022973; NM_022972; NM_022971; NM_022970; NM_022969; NM_023029; NM_000141; AF312678; M9719;
 45 NM_02407; AF304379; AF304378; AF304377; AF000549; NM_001755; AF172398; AF317655; AF317653;
 AF317652; NM_022036; NM_018653; NM_000707; NM_000706; NM_021923; NM_002011; NM_022963;
 NM_022965; NM_000142; NM_022336; NM_018654; AF312230; AY016370; E32517; E32511; E32510; E32509;
 E32504; E32503; E60222; E36078; AJ309545; AF323176; AF329496; NM_015717; NM_012329; AH009956;
 AF230330; AF316895; NM_021905; NM_016730; NM_016729; NM_016725; NM_016724; NM_004406; L27609;
 50 U65905; U65904; U65903; NM_016731; AF316870; AX074315; AX074314; NM_022113; AF283296; NM_014688;
 NM_000916; NM_000915; NM_004951; NM_021990; NM_021987; NM_021984; AY011291; AF316894; AJ300340;
 AF063605; AF319440; AF319439; AF319438; NM_021912; NM_021911; NM_000814; NM_000812; NM_006786;
 NM_021995; AJ300444; AJ300443; AJ300442; AJ300441; AJ300440; AJ300439; AJ300438; AJ300437; AJ300436;
 AJ300435; AJ300434; AJ300433; AJ300432; AJ300431; AJ300430; AJ300429; AJ300428; AJ300427; AJ300426;
 55 AJ300425; AJ300424; AJ300423; AJ300422; AJ300421; AJ300420; AJ300419; AJ300418; AJ300417; AJ300416;
 AJ300415; AJ300414; AJ300413; AJ300412; AJ300411; AJ300410; AJ300409; AJ300408; AJ300407; AJ300406;
 AJ300405; AJ300404; AJ300403; AJ300402; AJ300401; AJ300400; AJ300399; AJ300398; AJ300397; AJ300396;
 AJ300395; AJ300394; AJ300393; AJ300392; AJ300391; AJ300390; AJ300389; AJ300388; AJ300387; AJ300386;
 AJ300385; AJ300384; AJ300383; AJ300382; AJ300381; AJ300380; AJ300379; AJ300378; AJ300377; AJ300376;
 60 AJ300375; AJ300374; AJ300373; AJ300372; AJ300371; AJ300370; AJ300369; AJ300368; AJ300367; AJ300366;
 AJ300365; AJ300364; AJ300363; AJ300362; AJ300361; AJ300360; AJ300359; AJ300358; AJ300357; AJ300356;
 AJ300355; AJ300354; AJ300353; AJ300352; AJ300351; AJ300350; AJ300349; AJ300348; AJ300347; AJ300346;
 AJ300345; AJ300344; AJ300343; AJ300342; AJ300341; NM_000832; NM_021709; NM_006427; NM_016232;
 AF202091; AF202090; AF202089; AF202088; AF202087; AF202086; AF202085; AF202084; AF202083; AF202082;
 65 AF202081; AF202080; AF202079; AF202078; AH009943; NM_021602; NM_000626; NM_021601; NM_007327;
 NM_021569; NM_021270; NM_002288; NM_004041; NM_020251; NM_000872; NM_019860; NM_019859;

ES 2 441 724 T3

NM_004302; NM_020328; NM_020327; NM_020525; NM_000407; NM_018971; NM_017455; NM_002197;
 NM_005242; NM_016388; NM_016334; NM_016318; NM_016602; NM_013964; NM_013962; NM_013961;
 NM_013960; NM_013959; NM_013958; NM_013957; NM_013956; NM_007334; NM_002262; NM_007319;
 5 NM_007318; NM_007333; NM_007328; NM_002259; NM_006350; NM_013409; NM_012486; NM_012485;
 NM_012484; NM_012428; NM_012226; NM_012369; NM_007325; NM_000632; NM_007097; NM_000655;
 NM_005751; NM_005691; NM_005534; NM_005682; NM_005446; NM_004958; NM_004495; NM_003995;
 NM_003994; NM_000115; NM_000734; NM_003856; NM_002980; NM_000447; NM_000021; NM_000907;
 NM_000899; NM_002353; NM_002261; NM_000836; NM_000828; NM_000813; NM_003991; NM_001337;
 10 NM_001834; NM_001783; AF277897; AF192403; AF259263; AF259262; AF246971; AF240467; AF230073;
 BC000783; NM_016184; AF242540; NM_020979; NM_018557; NM_012452; NM_005338; AF321238; AF125253;
 NM_014211; AF283463; AF224266; AB045370; AB045369; NM_016363; NM_022139; NM_004403; AF308156;
 NM_022789; AX054991; AX054989; AJ278581; AJ302556; 5855: AJ302555; AJ302554; AJ302553; AJ302552;
 AF209481; AH009824; AF313449; AH009659; NM_002351; NM_000171; NM_000569; NM_000802; NM_003979;
 15 AJ302633; AJ302623; AJ302622; AJ302621; AJ302620; AJ302619; AJ302617; AJ302616; AJ302615; AJ302614;
 AJ302613; AJ302612; AJ302611; AJ302610; AJ302609; AJ302608; AJ302607; AJ302606; AJ302605; AJ302604;
 AJ302603; AJ302602; AJ302601; AJ302600; AJ302599; AJ302598; AJ302597; AJ302596; AJ302595; AJ302594;
 AJ302593; AJ302592; AJ302591; AJ302590; AJ302589; AJ302588; AJ302587; AJ302586; AJ302585; AJ302584;
 AJ302583; AJ302582; AJ302581; AJ302580; AJ302579; AJ302578; AJ302577; AJ302576; AJ302575; AJ302574;
 20 AJ302573; AJ302572; AJ302571; AJ302570; AJ302569; AJ302568; AJ302567; AJ302566; A302565; AJ302558;
 AJ302557; AJ302551; AJ302540; AJ302539; AJ302538; AJ302537; AJ131724; AF305200; AH003378; L38023;
 L38024; L38023; L38022; L38021; L38020; NM_012152; MM_007360; AF263029; AF263028; AF263027;
 AF263026; AF263025; AF263024; AF263023; AF263022; AF263021; AF263020; AF263019; AF263018; AF263017;
 AF263016; AH010208; AF310676; AF310250; AF276292; AF272157; AF271608; AF271607; AF223941; AF196176;
 25 AF196175; AF125539; AF125538; AH010139; AF308571; AF275260; NM_007161; AF289204; AF289203;
 AH010109; AF217689; AF217688; AH010108; AB045011; AF281074; AJ400846; AJ400845; AB024327; AF280547;
 AF280546; AF280545; AF280544; AF268899; AF268898; Y19228; Y19231; Y19230; Y19229; AX047952;
 AX047940; AX047936; AJ272207; AF311306; NM_022146; NM_004885; NM_002958; AF217485; NM_005856;
 NM_005854; NM_005855; NM_000025; AF245390; AF245389; AF245388; AF292402; NM_002855; AH010043;
 30 AF260137; X76400; NM_022159; NM_022150; NM_022049; AF281308; AF217487; NM_003553; AF208054;
 NM_018690; AB044934; NM_003555; NM_003552; NM_003554; AF264014; AF169007; AF169006; AF159854;
 AF032124; NM_002644; AJ249248; AJ277028; AF072872; AF073727; NM_002551; NM_000870; AB042411;
 AB042410; AJ289159; AF279762; AF279761; AF279760; AF279759; AF279758; AF279757; AF279756; AF279755;
 AH010002; AF260529; AF260528; AF260527; AF260526; AF260525; AF260524; AF260523; AF260522; AF260521;
 35 AF260520; AF260519; AF260518; AF260517; AF260516; AF260515; AF260514; AH010001; AF175406;
 NM_017416; AJ295237; NM_004720; AF298770; NM_005226; NM_021803; NM_021799; AF307973; X76026;
 AF200220; AF200219; AH009974; NM_017581; AB040290; AB040104; AF308542; AJ271338; AJ242738;
 AJ242737; NM_005508; NM_005283; AJ238419; AJ238418; AJ238417; AJ238416; AJ238415; AJ238414;
 AF074042; AF074041; AF074040; AF074039; AF074038; AF074037; AF074036; AF074034; AF074033; AF074032;
 40 AF074031; AF074030; AF074028; AF074027; AF074026; AF074025; AF074024; AF074023; AF074022;
 NM_000450; AF254069; AF254067; AF251510; AF251509; AB043943; AB043821; AB043820; AB043819;
 N_000527; NM_012407; NM_005232; NM_000214; NM_000875; AF298812; AF197929; NM_021642; AF280400;
 AF280399; AF263523; NM_001117; NM_002355; NM_000541; NM_021130; NM_001106; NM_001616;
 NM_001105; NM_001136; NM_000866; NM_000629; NM_000621; NM_000610; NM_000585; NM_000586;
 45 NM_000577; NM_000576; NM_000570; NM_000566; NM_000564; NM_000525; NM_003841; NM_001307;
 NM_000640; NM_001993; NM_013252; NM_020547; NM_018970; NM_014292; NM_019897; NM_014499;
 NM_017572; NM_020406; NM_020377; NM_002295; NM_019839; NM_018969; NM_018949; NM_000804;
 NM_000803; NM_017526; NM_017532; NM_017442; NM_016946; NM_013280; NM_013431; NM_016568;
 NM_015863; NM_015868; NM_016540; NM_001059; NM_014030; NM_014521; NM_014285; NM_014566;
 50 NM_014565; NM_014221; NM_014387; NM_014514; NM_014513; NM_014512; NM_014511; NM_014219;
 NM_014218; NM_014271; NM_014339; NM_014619; NM_014626; NM_014627; NM_014373; NM_005529;
 NM_005415; NM_005199; NM_013940; NM_013440; NM_013439; NM_002260; NM_012125; NM_013378;
 NM_013261; NM_013269; NM_013289; NM_013281; NM_013231; NM_012410; NM_012391; NM_012375;
 NM_012368; NM_012360; NM_012352; NM_012351; NM_012344; NM_012314; NM_012313; NM_012312;
 55 NM_012211; NM_012275; NM_004525; NM_004304; NM_000686; NM_007366; NM_005385; NM_005266;
 NM_000827; NM_001619; NM_000810; NM_003006; NM_001480; NM_001992; NM_000677; NM_001526;
 NM_000885; NM_002377; NM_000887; NM_000419; NM_002203; NM_000843; NM_000838; NM_000835;
 NM_000834; NM_000833; NM_007155; NM_007124; NM_007114; NM_007273; NM_007160; NM_007227;
 NM_006934; NM_007011; NM_007045; NM_006889; NM_006749; NM_006770; NM_006840; NM_006866;
 60 NM_006863; NM_006847; NM_006865; NM_006864; NM_006738; NM_006737; NM_006564; NM_001561;
 NM_006664; NM_006583; NM_006505; NM_006637; NM_006669; NM_006611; NM_006496; NM_006529;
 NM_006639; NM_006233; NM_006238; NM_006189; NM_006182; NM_006180; NM_006403; NM_006143;
 NM_006404; NM_006419; NM_005954; NM_006006; NM_006072; NM_005972; NM_005913; NM_005912;
 NM_006028; NM_005628; NM_005767; NM_005592; NM_005874; NM_005810; NM_005544; NM_005535;
 65 NM_005683; NM_005684; NM_001621; NM_005429; NM_005424; NM_005408; NM_005328; NM_005314;
 NM_005311; NM_005308; NM_005286; NM_005285; NM_005284; NM_005458; NM_005282; NM_005306;

ES 2 441 724 T3

NM_005305; NM_005304; NM_005303; NM_005281; NM_005302; NM_005301; NM_005300; NM_005299;
 NM_005298; NM_005297; NM_005296; NM_005295; NM_005294; NM_005293; NM_005279; NM_005291;
 NM_005290; NM_005268; NM_005264; NM_005246; NM_005233; NM_005227; NM_005211; NM_005161;
 5 NM_005092; NM_005118; NM_005048; NM_004963; NM_005145; NM_004952; NM_004736; NM_004664;
 NM_004195; NM_004612; NM_004154; NM_004244; NM_002332; NM_004514; NM_004633; NM_004512;
 NM_000826; NM_004224; NM_004246; NM_004293; NM_002030; NM_004469; NM_004107; NM_004101;
 NM_004447; NM_004431; NM_004093; NM_004429; NM_004428; NM_004393; NM_004383; NM_004778;
 NM_004382; NM_004072; NM_004329; NM_004313; NM_004039; NM_000806; NM_002529; NM_000395;
 10 NM_000211; NM_000208; NM_000206; NM_000416; NM_000201; NM_000459; NM_001053; NM_001052;
 NM_001051; NM_001050; NM_001049; NM_000245; NM_000242; NM_000237; NM_000236; NM_000233;
 NM_000222; NM_000212; NM_000418; NM_000417; NM_001551; NM_000859; NM_001525; NM_001510;
 NM_000829; NM_001496; NM_000820; NM_000155; NM_000816; NM_000815; NM_000811; NM_000809;
 NM_000808; NM_000807; NM_000121; NM_000118; NM_000114; NM_001365; NM_000080; NM_000751;
 NM_000747; NM_000079; NM_000074; NM_000073; NM_000072; NM_000388; NM_000069; NM_000041;
 15 NM_000684; NM_001116; NM_001115; NM_004001; NM_003931; NM_003383; NM_003382; NM_000376;
 NM_003329; NM_000369; NM_003301; NM_001244; NM_003809; NM_001243; NM_001242; NM_000043;
 NM_003327; NM_001065; NM_001192; NM_003820; NM_003790; NM_002546; NM_003839; NM_003840;
 NM_003842; NM_003844; NM_003692; NM_003273; NM_003272; NM_000460; NM_003844; NM_003692;
 20 NM_003273; NM_003272; NM_000460; NM_000361; NM_003243; NM_003234; NM_003608; NM_001060;
 NM_001057; NM_003177; NM_003070; NM_003045; NM_003037; NM_001036; NM_001035; NM_002921;
 NM_002852; NM_002851; NM_000316; NM_000960; NM_000959; NM_000958; NM_000957; NM_000955;
 NM_000952; NM_002769; NM_000949; NM_002745; NM_002702; NM_003967; NM_002659; NM_000926;
 NM_000288; NM_000287; NM_002618; NM_002591; NM_002586; NM_002569; NM_002565; NM_002566;
 25 NM_002562; NM_002561; NM_002560; NM_002559; NM_002556; NM_003696; NM_002550; NM_002548;
 NM_000914; NM_000912; NM_000911; NM_002543; NM_003485; NM_002531; NM_002530; NM_003580;
 NM_003872; NM_003873; NM_000910; NM_000909; NM_000908; NM_000906; NM_002511; NM_003954;
 NM_002507; NM_002447; NM_002445; NM_000529; NM_002386; NM_002349; NM_002344; NM_000752;
 NM_002336; NM_002319; NM_002303; NM_002291; NM_002258; NM_002255; NM_002227; NM_002210;
 30 NM_002205; NM_001565; NM_001557; NM_000634; NM_002185; NM_002184; NM_000565; NM_000878;
 NM_003854; NM_000877; NM_003853; NM_002189; NM_001559; NM_001558; NM_000876; NM_000871;
 NM_000869; NM_000868; NM_000867; NM_000865; NM_000863; NM_000524; NM_000186; NM_001523;
 NM_000845; NM_000844; NM_000841; NM_000840; NM_000831; NM_000830; NM_002086; NM_002082;
 NM_001504; NM_001508; NM_001507; NM_001506; NM_001505; NM_000173; NM_000824; NM_002063;
 35 NM_000164; NM_000823; NM_000163; NM_000160; NM_003614; NM_002043; NM_002042; NM_002036;
 NM_001462; NM_002029; NM_001461; NM_002020; NM_001459; NM_002019; NM_002002; NM_002001;
 NM_003950; NM_001981; NM_001974; NM_001423; NM_003757; NM_001406; NM_001962; NM_001405;
 NM_003775; NM_001945; NM_001360; NM_003467; NM_001338; NM_003478; NM_001330; NM_000760;
 NM_003805; NM_001877; NM_001842; NM_001281; NM_000750; NM_000749; NM_000748; NM_000746;
 40 NM_000745; NM_000744; NM_000742; NM_000741; NM_000740; NM_000739; NM_000738; NM_001768;
 NM_001781; NM_001779; NM_000733; NM_000732; NM_001775; NM_001767; NM_001837; NM_000731;
 NM_000730; NM_001742; NM_001737; NM_001736; NM_001732; NM_001729; NM_001727; NM_001203;
 NM_000710; NM_003921; NM_001168; NM_001150; NM_001146; NM_000676; NM_000674; NM_001118;
 AF287270; AF287269; AF307080; AF307079; AF265242; AF018284; AF017307; AF106912; AB042033; AB019000;
 45 AH007076; AF019765; AF019764; AF035819; AF253318; AF077186; AF272363; AF272362; AJ277437; G64264;
 G64261; G64251; G64250; G64249; AF301005; AF269133; AF127670; AF284436; AF284435; AF284434; M35198;
 AF302903; AF286095; AF239668; AF029759; AB041644; AF237381; AF237380; AH009867; AF233516; A297688;
 AJ297701; AJ297700; AJ297699; AJ297698; AJ297697; AJ297696; AJ297695; AJ297694; AJ297693; AJ297692;
 AJ297691; AJ297690; AJ297689; AJ276452; AF254664; AC005330; AF176039; AB041228; AF282262; AF282261;
 50 AF282260; AF282259; X80389; AF177761; AF005058; AF264716; AF264715; AF250237; AF189277; AB010994;
 AB010993; AB010581; SEG_AB010581S; AX015117; AX015116; AX015115; AX015114; AX015113; AX015112;
 AX015111; AX015110; AF042080; AF255342; AF254747; AJ295613; AJ278681; AF217963; AF169970; AF169969;
 AB044402; U96190; U96189; U96188; AF251841; AF251840; AF251839; AF251838; AF251837; AF251836;
 AF251835; AF251834; AF251833; AF251832; AF251831; AF251830; AF251829; AF251828; AF251827; AF251826;
 55 AF251825; AF251824; AF251823; AF251822; AF251821; AF251820; AF251819; AF251818; AH009773; AF189768;
 AJ245377; X07206; AF246974; AF246973; AF246972; AF215826; AF215825; AB008193; AB029892; AF211978;
 AF211977; AF211976; AF211975; AF211974; AF211973; AF211972; AF211971; AF211970; AF211969; AF211968;
 AF211967; AF211966; AF262016; AF242865; AF242864; AF242862; AH009718; AF257210; AF292403; AF288571;
 AF146747; AF233092; AF269144; AF269143; AF269142; AF269141; AF269140; AF269139; AF269138; AF269137;
 AF269136; AF269135; AH009710; AF211942; AF211941; AF211940; AF211939; AJ272029; AF101726; AF101725;
 60 AF101728; AF101727; AF064078; S82307; S83176 S82755; S82612; AF238374; AJ400843; AJ400842; AJ400841;
 AJ005205; AB038269; AJ278476; AJ278475; AF282693; AF254409; AF236117; AF287008; AF172171; AF172170;
 AF172169; AH009665; AF165312; AJ245375; AF277230; AF114491; AF107259; AF107257; AZ081535; AF285168;
 AC018755; AF246303; AF246302; AF246301; AF246300; AF246299; AF246298; AF246297; AF246296; AH009223;
 U94888; AB040434; AJ272427; U88356; U88355; U88354; AB037533; AF180301; AF208111;
 65 AF208110; M15222; AF263279; AF242874; AF160477; AF058290; AF082516; X06031; X06030; X06029; X06027;
 Z30426; AJ278605; AF246925; AF246924; AF246923; AF246922; AF246921; AF246920; AF246919; AF246918;

ES 2 441 724 T3

AF246917; AF246916; AF246915; AF246914; AF246913; AF246912; AF246911; AF246910; AF246909; AF246908;
 AF246907; AF246906; AF246905; AF246904; AF246903; AF246902; AF246901; AF246900; AF246899; AF210633;
 M22057; AF212311; AF141334; AF277379; AJ251962; AJ251961; AF062039; AF141333; AF141332; X56253;
 5 AF155912; AF263744; X56254; AB040801; AB040800; AB040799; AF187064; AF045606; AF204920; AF204919;
 AF204918; AH009422; AF204917; AF204916; AF204915; AH009421; AF204914; AF204913; AF204912; AH009420;
 AF204911; AF204910; AF204909; AH009419; AF204905; AF204904; AF212842; AF208237; AF204903; AP001716;
 AP001705; AP001670; AP001717; AJ012074; AF039906; S77335; S75765; S78717; X15266; X15265; AF220542;
 AF073924; D88437; AB032369; AF167555; AF002982; AF002981; AF002980; AF002979; AH005453; AF003123;
 10 AF003122; A003121; AF003120; AF003119; AF003118; AF003117; AF003116; AF196329; AF167342; AF167341;
 AF167340; AF167339; AF167338; AF167337; AF167336; AF167335; AF167334; AF167333; AH009309; AF167343;
 AF213457; AF233281; AF189259; AF176832; AH001455; M11767; M11766; M11765; M11764; M11763; M11762;
 M11761; AC068948; AF060231; Z24459; AB006200; AB023493; M55336; AB028741; U27478; M81774; S70782;
 S70057; S70123; S56143; S57793; AF202640; AF211154; AF211153; AF145440; AF145439; AF129170; AF129169;
 AH009264; AB039723; AC053940; AC067969; AF236081; AC004416; AF056019; AF052244; AF068282;
 15 AF186022; AB002168 AB002167; AB002166; AB002165; AB002164; AB002163; AB002162; AB002161; AB002160;
 AB002159; AB005647; AB005646; AB005645; AB005644; AB005643; AB005642; AB005641; AB005640;
 AB005639; AB005638; AB005637; AB005636; AB005635; AB005634; AB005633; AB005632; AB005631;
 AB005630; AB005629; AB005628; AB005627; AB005626; AF030335; AF003522; AF003521; AF068292; AH007819;
 AF156158; AF156160; AF156159; AB041713; AF041811; AF172453; AF172452; AF172451; AF172450; AF172449;
 20 D49394; AB041395; AB041391; AB041384; AB041380; AB041373; AB041370; AB033598; AB033597; AB033596;
 SEG_AB033597S; D85606; SEG_AB019480S; AB019485; SEG_AB029932S; AB029933; AB029932; AB029931; AB026584;
 AB017444; AB017443; AB017442; AB017441; AB017440; AB017439; AB019488; AB019487; AB019486;
 AB019484; AB019483; AB019482; AB019481; AB019480; SEG_AB01471S; AB014718; AB014717; AB014716;
 AB014715; AB014714; AB014713; AB014712; AB014711; AB014710; SEG_AB01047S; AB010491; AB010490;
 25 AB010489; AB010488; AB010487; AB010486; AB010485; AB010484; AB010483; AB010482; AB010481; AB010480;
 AB010479; AB010478; AB010477; AB010476; AB010475; AB010474; AB010473; AB010472; AB010471;
 AB010470; AB008681; SEG_AB005521S; AB005526; AB005525; AB005524; AB005523; AB005522; AB005521;
 AB002059; SEG_D86389S; D86407; D86406; D86405; D86404; D86403; D86402; D86401; D86400; D86399;
 D86398; D86397; D86396; D86395; D86394; D86393; D86392; D86391; D86390; D86389; D86096; D86095;
 30 D86094; D86093; D86092; D86091; D86090; D86089; D86088; D86087; SEG_D49555S; D85376; D85375; D49559;
 D49558; D49557; D49556; D49555; D64016; D38128; D38127; D37965; D50017; D50016; D50015; D50014;
 D50013; D50012; D50011; D50010; D50009; D50008; D50007; D50006; D50005; D50004; D50003; D50002;
 D50001; D31793; D28768; D28769; D31708; D26535; SEG_HUMTA2R; D15056; D15055; D15054; D15053;
 D21219; D21218; D16532; D16531; D16530; D16529; D16528; D16527; D16526; D16525; D16524; D16523;
 35 D16522; D16520; D16518; D16517; D16516; D16515; D16514; D16512; D16510; D16508; D16495; D13168; D13167; D13166;
 D13165; D13164; D13163; D13162; D10604; D11151; D11150; D11149; D11148; D11147; D11146; D11145;
 D11144; AF215981; AF065440; AF228458; AF228457; AF228456; AF228455; AF228454; AF228453; AF228452;
 AF228451; AF228450; AH009226; AJ272208; AF056085; AF161081; AF161080; AF228449; AF228448; AF228447;
 AH009221; AF198052; AF159278; AF159277; AF159276; AF159275; AF159274; AF159273; AF159272; AF159271;
 40 AF159270; AF159269; AF159268; AF159267; AF159266; AF159265; AF159264; AF159263; AF159262; AH009217;
 AF176812; AF193507; AF105239; AF105238; AF105237; AF105236; AF105235; AF105234; AF105233; AF105232;
 AF105231; AH009212; AF104856; AF104855; AF104854; AF104853; AF104852; AF104851; AF104850; AF104849;
 AF104848; AH009211; A130742; AF130741; AF130740; AF130739; AF130738; AF130737; AF130743; AB032593;
 AB032592; AF110640; AF181286; AF181285; AF181284; G64286; AF145712; AB031325; AF112461; AF112460;
 45 AF184174; AF175207; AF175206; AJ271348; AF180814; AF180813; AF180812; AF180811; AF180810; AF180809;
 AF180808; AF180807; AF180806; AH009157; AF087930; AF087928; AF087926; AF087925; AF087924; AF087923;
 AF087922; AF087918; AF087917; AF087916; AC010582; AC010072; AF155225; AC007262; AC002085;
 AC006531; AC004164; AF200949; AF124841; AF210818; AF134838; U89326; AJ003080; AJ003079; AJ003078;
 AC024126; AC024124; AC024123; AF226728; AL157442; AF217796; AL137719; AL137432; AL137375; AL137288;
 50 AL137651; AL133666; AL133097; AL133058; AL133030; AL117432; AL096753; AL080164; AL050071; AL049924;
 X68559; AF228312; AF199028; AF225903; AF222340; AF201349; AF201343; AJ271729; AF217794; AF217793;
 AF152238; X89271; AJ240085; AJ271684; AJ243213; AC003075; AC003078; AC002381; AC005155; D50678;
 D31770; D50516; D31661; D17516; D16105; D16494; D16493; G63891; G63890; AF148806; AF189251; AF202063;
 AF201951; AB037108; AF209721; AJ238323; AB036432; AF192548; AF184971; AJ012288; AB035073; AF217403;
 55 AF200465; AJ243342; AJ223183; AF006265; AF159570; D29952; NM 004441; AF133299; AF110265; AF061779;
 AF118224; AF125809; AF125808; AJ000542; AF190826; AF190825; AF190824; AF190823; AF190822; AH008809;
 AF159621; AF159620; AF159619; AF159618; AF159617; AF159616; AH008808; AF108205; AF108204; AF108203;
 AF108202; AF108201; AF108200; AF108199; AF108198; AF108197; AF108196; AF108195; AF108194; AF108193;
 AC005009; AF047487; AC004822; AC002543; AC002081; AF106698; AH002552; L29197; M11811; AF119666;
 60 AF109683; AH008758; AF109291; AF109290; AF109289; AF109288; AF109287; AF109286; AF109285; AF109284;
 AF109283; AF109282; AF109281; AF109280; AF109279; AF109278; AF109277; AF109276; AF109275; AF109274;
 AF109273; AF109272; AF109271; AF109270; AF109269; AF109268; AF109267; AF109266; AF109265; AF109264;
 AF109263; AF109262; AF109261; AF109260; AF109259; AF109258; AF109257; AF109256; AF109255; AF109254;
 AF109253; AF109252; AF109251; AF109250; AF109249; AF109248; AF109247; AF109246; AF109245; AF109244;
 65 AF178684; AQ917583; AQ917582; AQ917581; AQ917580; AQ917579; AQ917578; AQ917577; AQ917576;
 AQ917575; AQ917574; AQ917573; AQ917572; AQ917571; AQ917570; AQ917569; AQ917568; AQ917567;

AQ917566; AH008470; AF182397; AF068757; AF166329; AJ251595; AF100772; AF100634; AH008438; AF019638;
 AB010445; AF119330; AF119329; AF119328; AL021940; AF152113; AB022178; AB022177; AJ251004; AJ133822;
 Y18994; AF177766; AH008297; AF083854; AF083853; AF083852; AF083851; AF083850; AF083849; AF083848;
 5 AF083847; AF083846; AF083845 AF083844; AF083843; AF083842; AF083841; AF083840; AF083839; AF083838;
 AF083837; AF083836; AF083835; AF083834; AF083833; AF083832; AF083831; AF083830; AF083829; AF083828;
 AF083827; AF083826; AF083825; AF083824; AF083823; AF083822; AF083821 AF083820; AF083819; AF083818;
 AF083817; U68492; AB032417; AF191093; AJ130713; AJ130712; AJ130711; AJ130710; AJ007395; X95097;
 Y18423; Y18431; Y18430; Y18429; Y18428; Y18427; Y18426; Y18425; Y18424; X57250; AF200348; AH008357;
 10 AF169366; AF169365; AF169364; AF169363; AF169362; AF169361; AF169360; AF181862; AF178632; X80763;
 X68149; AF187320; AF154673; AF169255; AJ133107; Y18403; Y18402; Y18401; Y18400; Y18399; Y18398;
 Y18397; Y18396; Y18395; Y18394; Y18393; Y18392; Y18391; Y18390; Y18389; AF095725; AH007997; AF134202;
 AF134201; AF139768; X75318; AJ245822; AJ245820; L46722; X87831; AJ000994; X84761; X84760; X84759;
 X84758; X84757; X84756; X84754; X84753; X84763; X84762; AF140631; AF140630; AF040752; AF040751;
 15 AF040753; X87832; X87904; AJ011415; AJ011414; X07019; X54559; AF186380; AF147204; AF029213; Z24462;
 Z24455; AF124598; AF124145; AF118637; AF127138; AF104939; AF104266; X51646; X51645; AB010447;
 AF137378; AJ243212; AJ243874; AF091352; AF159456; AB023486; AF104938; U81379; AH008056; AF129514;
 AF129513; AF101472; AF072693; A246000; AJ224864; AJ132948; AB027464; AJ133532; AJ223153; AB025257;
 Y16434; Y16433; AF144648; AF151104; AF039686; AF000548; X83701; X83700; X83702; G16210; AH008077;
 20 AF130996; AF130995; AF130994; AF130993; AF130992; AF130991; AF130990; AF130989; AF130988; AF033111;
 AJ238044; X95425; AF135562; AF135561; AF135560; AF135559; AF135558; AF135557; AF135556; AF135555;
 AF135554; AF135567; AF135566; AF135565; AF135564; AF135563; AF172932; AF162790; AF161921; AF161920;
 AF161919; AF161918; AF161917; AF161916; AF161915; AF161914; AF161913; AF161912; AF161911; AF161910;
 AF161909; E17202; E17201; E16188; E16187; E16186; E16000; E15999; E15998; E15997; E15919; E15918;
 E15242; E14946; E14587; E14586; E14585; E14219; E14218; E14217; X83699; AF007790 AF036718; AF099033;
 25 AF009221; AF009220; AF067864; Asp040257; AF026245; AF163302; AF153500; AH007996; AF126038;
 AF126037; AF126036; AF081675; AF145782; AH007960; AF101171; AF101170; AF101169; AF101168; AF101167;
 AF101166; AF101165; AF107761; AF109127; AF109126; Y17131; X57829; AF100762; AF109388; AF109387;
 AF118108; AF119711 X72861; AF103906; AF072873; AF153437; AF153436; AF153435; AF153434; AF153433;
 AF153432; AF153431; AH007879; AF128186; AF128185; AF128184; AF128183; AF128182; AF128181; AF128180;
 30 AF128179; AF128178 AF128177; AF128176; AF128175; AF128174; AF128173; AF128172; D50855; D49783;
 D16826; D29984; D14436; D16827; D14717; AF073515; AH007696; AF097354; AF097353; AF097352; AF097351;
 A097350; AF097349; AF097348; AF097347; AF097346; AF097345; AF097344; AF097343; A097342; AF097341;
 AF097340; AF097339; AF097338; AF097337; AF097336; U58146; AF134395; AF015044; AF015043; AF145207;
 AB018549; AH007443; AF091544; AF152962; AF140538; AJ238896; AF0399904; AF039905; A039907; AB020807;
 35 AF144308; AF107262; AH007742; AF140765; AF140764; AF140763; AF140762; AF140761; AF140760; U19261;
 AF105261; AH007727; AF091870; AF091869; AF091868; AF091867; A091866; AF091865; AF091864; AF091863;
 AF091862; AF091859; AJ132337; A120152; AF120151; D13814; AJ236922; AJ236921; AF106858; AF095784;
 AJ006520; AF110907; AJ002425; Y15220; AJ005282; AJ012188; AJ012187; AJ012186; AJ012185; AF129112;
 AF068265; AB020625; AH007576; AF110035; AF110034; AF110033; AF110032; AF114165; AF105999; AH007573;
 40 AF134316; AF134315; AF134313; AF134312; AF134311; AH007572; AF133900; AF133899; AF133898; AF133897;
 AF133896; AF133901 AF069755; AC007229; AF125303; AF058762; AF096786; AF096784; AF119815; AF098664;
 AF090131; X95583; AJ131757; X58674; U51134; Y13464; Z66558; Z66557; Z66556; AF118266; AF118265;
 Y18046; AJ006276; M13918; D13515; D10583; AH007490; AF102063; AF102062; AF102061; AF102060;
 AF102059; AF098798; AF118670; AF053072; AF052539; AF117713; AF117297; Z29585; AF050154; X97881;
 45 X97880; X97879; AJ007787; AJ007786; AJ007785; AJ007784; AJ007783; AJ001939; AJ001938; AJ001937;
 AJ001936; AJ001935; AJ003147; AJ225029; AJ003147; AJ225029; AJ225028; AJ132194; AJ012753; AJ012332;
 AJ012331; AJ011701; AJ010191; AJ010190; AJ010189; AJ010188; AJ010187; AJ010186; AJ010185; AJ010184;
 AJ010183; AJ010182; AJ010181; AJ7010180; AJ010179; AJ010178; AJ010177; AJ010176; AJ010175; AJ010174;
 AJ010173; AJ010172; AJ010171; AJ010170; AF061022; AF052041; AC006953; AF105367; AH007439; AF085452;
 50 AF085451; AF065213; AF065212; AF065211 AF065210; AF051305; AF051305; U87223; AF022386; AF011368; AF016267;
 AF020502; AF020501; AF075460; AF054830; AF099082; AF089744; AF001095; AF101784; AF080586; U71374;
 AF111116; AF110314; AF069543; U81262; AF097358; AF029761; AF074483; AC006293; AF104419; AF046059;
 AF041262; AF041261; AH007196; AF035670; AF035669; AF035668; AF035667; AF035666; AF035665; AF035664;
 AF035663; AF035662; AF037332; AF037331; AH007119; AF072410; AF072409; AF072408; AF072407; AH007118;
 55 AF072101; AF072100; AF072099; AF106941; AF104304; AF034780; AF109401; AF099148; AF095448; L34689;
 AF100161; AF082076; AC006132; AH007081; AF079167; AF079166; AF079165; AF079164; AF099083; AF058390;
 AF058389; AF029839; AF029838; AH007062; U90660; U90659; U90658; AF041474; AF097942; AH007044;
 AF084941; AH007043; AF043129; AF043128; AF043127; AF043126; AF043125; AF043124; AF043123; AH007033;
 AF068679; AF068678; AF068677; AF068676; AF035776; AF091501; X98174; X68990; X63128; AF074397;
 60 U72648; Y10148; Y12476; AJ000479; Y12477; X04329; AH007002; AF091493; AF091492; AF077820; AF055992;
 U58675; AF077346; Z17227; AF082742; Z34897; X76786; AC005933; AF094755; AF094754; AF091512;
 AF065876; AF065874; AF065870; AF065863; AF065861; AF065860; AH006968; AF039523; AF039522; AF039521;
 AF039520; AF039519; A039518; AF039517; AF039516; AF039515; AF039514; AF039513; AF039512; AF039511;
 AF039510; A030186; AJ006353; AF055634; AH006936; AF060201; AF060200; AF060199; AF037646;
 65 AF036903; AH006931; AF058427; AF058426; AF058425; AF058424; AF058423; AF058422; AF058421; AF058420;
 AF058419; AF058418; AF058417; AF058416; AF058415; AF058414; AF058413; AF058412; AF058411; AF058410;

ES 2 441 724 T3

AF058409; AF058408; AF058407; AF058406; AF058405; AF058404; AF058403; AF058402; AF058401; AF058400;
 AF058399; AF058398; AF058397; Y11044; AF073019; AF072930; Y12670; AF091890; Y09586; X77777; AJ001383;
 AJ224901; AJ006123; AJ006122; AJ006121; X99906; U52064; U29343; AF035771; AF023849; AH006710; U19247;
 5 U19246; U19245; U19244; U19243; U19242; U19241; AF027957; AF027956; AF016709; AF035824; U96845;
 AF022139; AF022137; AF031556; AF031555; AF031554; AF031553; AF009644; AF009643; AF009642; AF009641;
 AF009640; AF009639; AF009638; AF009637; AF009636; AF009635; AF009634; AF009633; AF009632; AF014924;
 AF014923; AF011566; A011565; AF009007; AF009006; AF009005; AH006705; AF024516; AF024515; AF030625;
 AF002986; AF023-614; AF022860; AF022859; AF016849; AF013171; AF018956; AF015257; U75285; AF012270;
 10 AH006692; U97180; U97179; U97178; U97177; U97176; U97174; U97173; U97075; U97074; L76380; L49241;
 L49240; L49239; L49238; L49242; L49237; L40764; AF068181; A068180; AF064801; AH006513; AF017724;
 AF017723; AF017722; AF017721; AF017720; AF017719; AF017718; AF017717; AF017716; AF017715; AF018157;
 AF045764; AF053004; AF055872; AF057140; AF028785; AF027826; AF040630; U86281; U86280; U86279;
 U86278; U86274; U86270; U86264; AH006491; AF038420; AF038419; AF038418; AF038417; AF038416;
 15 AF038415; AF038414; AF038413; AF038412; AF038411; AF036906; AF036905; AF043724; U86239; U86238;
 U86237; U86236; U86235; U86234; U86222; U86216; U86215; AF016261; AF041245; AF041243; U97123;
 AF009014; AF036581; AF040991; AF040990; AF026070; AF021818; L48211; L47169; L47168; L47167; L37086;
 L36566; L25647; M85247; L21195; L22647; L10822; L19546; M95667; AF087138; AF042782; AF064548;
 AF073799; D10202; AB017498; AJ011041; AH006427; AF080456; AF080455; AF080454; AJ001689; AJ001688;
 20 AJ001687; AJ001686; AJ001685; AJ001684; AJ001683; Y12546; AF015525; AF015524; AF068868; AF052572;
 AC005625; AF051152; AF051151; AC005601; U88540; Z94155; Z94154; AF074264; AF021233; AF021232;
 Y98765; U50062; AF078925; AF061785; AB009462; AF075590; AF075589; L39064; AJ224878; AF080214;
 AF075005; AF062006; Y12815; AC005338; AF078530; AF077526; AH006311; AF074029; AF074035; U44132;
 Y14930; Y14931; Y14929; AF074087; Y12507; Y12506; D85242; D85241; AF034633; AF034632; AF054633;
 25 AF073792; AF007575; AF055917; AC005255; AB012724; AB015745; AF020498; AF051767; AH006188; AF009702;
 AF009701; AF009700; AF009699; AF009698; AF009697; AF009696; AF009695; AF009694; AF009693; E13909;
 E13892; E13385; E13006; E13005; E12979; E12916; E12845; E12752; E12750; E12703; E12702; E12658; E12487;
 E12484; E12354; E12281; E12186; E12185; AF009962; AF050525; U33328; U31416; U50748; Y14838; Y12505;
 Y08756; X85785; AH006173; AF001298; AF001297; AF048704; AF023676; AJ001016; Y13584; AF030339;
 30 AC004782; AF009662; AJ001015; AJ001014; AF011333; AJ001902; AF002216; AF002215; AF002214; AC002411;
 AF058927; AF058926; AC004699; Y13472; AF015452; AF015451; AF015450; AF063658; AJ224869; AH006106;
 AF061979; AF061978; AH006105; AF061324; AF061323; AF061322; AF061321; AF061320; AF061319; AF061318;
 AF061317; AF061316; AF061315; AF061314; AF061313; AF061312; AF061311; AF061310; AF061309; AF061308;
 AF061307; AF061306; AF061305; AF061304; AF061303; AF061302; A061301; AF061300; AF061299; AF061298;
 35 AF061297; AF061296; AF061295; AF061294; AF061293; AF061292; AF061291; AF061290; AF061289; U77783;
 AJ001515; AJ002512; AJ002511; Z81148; U71092; AH006056; AF058999; AF058998; AF058997; AF058996;
 AF058995; AF058994; AF058993; AF058992; AF058991; AF058990; AF044197; Y16280; U16260; AF057177;
 AF057168; L06155; L27490; L27489; L27488; AF009664; AF009660; AB006537; AF016098; AF016050; U90941;
 U90940; U90939; U90938; Y14739; Y07683; AF027390; U04357; AH006005; AF054598; AF054597; AF054596;
 40 AF054595; AF054594; AF054593; AF054592; AF054591; AF054590; L12406; AC004510; U84721; AF013261;
 AF014794; AC003658; AH005897; AF001977; AF001976; U78192; AF044492; AF044491; AF042078; AB010710;
 AF041462; AF041461; AF041460; AF041459; AF041458; Z73157; U58917; Y16282; Y16281; X98858; M76676;
 Y08420; Y08419; Y08417; Y08416; Y08415; Y08418; AF042077; AF042076; AF042075; AF042074; AF042073;
 45 AF042072; Y10530; Y10529; Z26876; Z50150; Y13055; Y13054; Y10437; Y10437; AJ002105; AJ002104; AJ002103;
 AJ002102; AJ000001; Y10141; Z97213; AF026263; AF026261; AF026260; AH005786; AF031237; AH005782;
 AF037334; AF037333; AF011406; U59632; D86864; AF027208; AB001025; D00017; Y08236; AF025998;
 AD000671; Z49119; Z48150; Y15743; AF000575; AF000574; Z26652; X82208; AF035261; AF032388; AF025534;
 AF025533; AF025532; AF025531; AF025530; AF025529; AF025528; AF025527; Y13583; Y13367; X82207;
 AF033854; X81882; AF024690; AF024689; AF024688; AF024687; D87513; D49919; AF030512; Y12852; Y12851;
 50 Y12854; Y12853; Y12855; AB005520; Y09765; Y09764; Y09763; AF026535; AF026071; AF022956; AF022955;
 AF022954; AF022953; AF014958; AB000712; X94609; AF025375; AF000380; U35875; AF010193; X94634;
 X94633; X94632; AF007892; AF007891; AF022383; X89860; Y08456; U95025; AF021799; U73443; AB000520;
 X98172; AH005567; AF001952; AF001951; AF001950; AF020201; Y14442; AF017061; AF017262; AF016917;
 Y13248; D83492; AB002058; AF015251; AF004231; AF004230; X90563; AF012629; AF012628; AF012536;
 55 AF012535; AF012903; X69316; X69315; X69314; X69313; X69312; X69311; X69310; X69309; X69308; X69307;
 X69306; X69305; AF005419; L42324; AF015910; X99250; AF007545; Z79783; Z49994; AF007555; AF008556;
 Y10152; Y10153; Y10151; M17325; M17324; M17323; AF004327; AF004021; AF006464; AF005637; Z24461;
 Z24463; Z24457; Z24456; U45984; AF005900; AF005210; Y16282; Y16281; X98858; M76676; Y08420; Y08419;
 Y08421; Y08417; Y08416; Y08415; Y08418; AF001985; AF042077; AF042076; AF042075; AF042074; AF042073;
 60 Y10530; Y10529; Z26876; Z50150; Y13055; Y13054; Y10437; AJ002105; AJ002104; AJ002103; AJ002102;
 AJ000001; Y10141; Z97213; AF026263; AF026261; AF026260; AH005786; AF031237; AH005782; AF037334;
 AF037333; AF011406; U59632; D86864; AF027208; AB001025; D00017; AF025998; AD000671; Z49119; Z48150;
 Y15743; AF000575; AF000574; Z26652; X82208; AF035261; AF032388; AF025534; AF025533; AF025532;
 AF025531; AF025530; AF025529; AF025528; AF025527; Y13583; Y13367; X82207; AF033854; X81882; AF024690;
 AF024689; AF024688; AF024687; D87513; D49919; AF030512; Y12852; Y12851; Y12854; Y12853; Y12855;
 65 AB005520; Y09765; Y09764; Y09763; AF026535; AF026071; AF022956; A022955; AF022954; AF022953;
 AF014958; AB000712; X94609; AF025375; AF000380; U35875; AF010193; X94634; X94633; X94632; AF007892;

AF007891; AF022383; X89860; Y08456; U95025; AF021799; U73443; AB000520; X98172; X92883; AH005567;
 AF001952; AF001951; AF001950; AF017263; AF020201; Y14442; AF017264; AF017061; AF017262; AF016917;
 Y13248; D83492; AB002058; AF015251; AF004231; AF004230; X90563; AF012629; AF012628; AF012536;
 5 AF012535; AF012903; X69316; X69315; X69314; X69313; X69312; X69311; X69310; X69309; X69308; X69307;
 X69306; X69305; AF005419; L42324; AF025910; X99250; AF007545; Z79783; Z49994; AF007555; AF008556;
 Y10152; Y10153; Y10151; M17325; M17324; M17323; AF004327; AF004021; AF006464; AF005637; Z24461;
 Z24463; Z24457; Z24456; U45984; AF005900; AF005210; Y13758; AF000546; U45983; X63819; X15274; X80282;
 X81086; X65857; X65858; Z69640; Z69641; Z70243; Z38109; AC002306; AF002256; AF002255; D89079; D89078;
 10 AB004662; Y07909; L17411; L17425; L17418; L17417; L17416; L17415; L17414; L17413; L17412; L17410; L17408;
 L17407; L17406; L17405; L17404; L17403; L17402; L17401; L17400; L17398; L17397; L17396; L17395; L17394;
 L17393; L17392; L17391; L17430; L17429; L17428; L17427; L17426; L17424; L17423; L17422; L17421; L17420;
 L17419; L17409; L17399; L17390; M14764; M11025; L31772; L31774; L31773; L07868; L19593; L19591; M69229;
 L03840; L13268; L13266; Y13426; Y08768; Y08110; E08844; E08843; E07873; E07650; E07649; E07358; E07377;
 E06799; E06798; E06797; E06796; E05678; E05211; E05210; E05109; E04823; E03879; E03829; E03378; E03278;
 15 E03335; E03268; E03267; E02673; E02541; E02151; E01646; E01052; E00999; E00990; E00727; E00723; E00685;
 D31833 D16845; D28131; D17517; D30780; D38299; D38298; D38301; D38300; D38297; D28538; D14872;
 D50582; D26070; D26156; D26155; D26351; D26350; D25418; D10924; D10923; D10922; D10925; D28481;
 D10995; D38449; D37827; D13305; D32201; D16354; D25235; D13538; D32202; D86519; D50683; D50682;
 D28472; D29634; D28539 Y09479; U97197; X81892; Y07619; D16815; X95876; AF000545; U95626; U77352;
 20 D86098; D86097; X98510; D89675; D43772; X89677; X89676; X89675; X89674; X89673; X89672; X89671;
 X89670; X89669; X89668; X89667; X89666; X73617; Z79612; Z79611; Z79610; Y09852; Z46223; Z46222; Y09561;
 Y09328; Y07593; X07205; X15272; Y11227; X74798; X80878; X70070; X94552; X89105; X92562; X92561; X92560;
 X92559; X92558; Z50197; Z50196; Z50201; X72304; X86169; X03131; X57740; X01719; X01715; Z30429; X89744;
 X87765; X87766; X87769; X87768; X87767; AH004970; L42243; L41944; L41943; L41942; L42242; L42241;
 25 L42323; L42240; L42239; L42238; L42237; X94647; X94630; X91747; X74979; Y10100; Y09028; Y07684; X95712;
 X97232; X97233; X97231; X97230; X97229; X99481; X99480; X99479; X98118; X83864; Z48923; X84939; X89604;
 Z70276; Z70275; Y09392; X99031; X99029; Y08162; X98194; X99025; X98147; X98193; X90753; X70812; Z22971;
 Z22970; Z22969; Z22968; X69680; Z79784; Z79782; X94374; X94373; X93596; X93595; X94262; X89772; X69516;
 X97671; X97874; X97873; X99404; Z49205; X89066; Y08218; X96586; Z48226; X91665; L05424; L05423; L05422;
 30 L05421; L05420; L05419; L05418; L05417; L05416; L05415; L05414; L05413; L05412; L05411; L05410; L05409;
 L05408; L05407; M69215; X91492; X91742; X91746; X91745; X91744; X91743; X91741; X91740; X91739; X91738;
 A34990; A23337; X95095; X91875; L40636; X55077; X98330; X80038; Z15017; Z36748; X97198; X81870; Z11168;
 M75105; M75104; M75103; M75102; M75101; X76981; X95302; X51469; X99027; X99026; X99024; X99023;
 X99034; X99033; X99032; X98208; X99030; X99028; X51470; L76631; L76627; L57508; L38019; X77748; M26016;
 35 X63717; L03718; X99269; X95536; X63745; X98133; X89893; X89892; X89891; X98178; X98177; X98175; X98176; X98173;
 X67594; X96597; M88714; AH003589; L78243; L78242; L78241; L78240; L78239; L78238; L78237; L78236;
 L78235; L78234; L78233; L78232; L78231; L78230; L78229; L78228; L78227; L78226; L78225; L78224;
 L78223 L78222; L78221; L78220; L78219; L78218; L78217; L78216; L78215; L78214; L78213; L78212;
 L78211; L78210; L78209; L78208; L78207; X80818; X89068; X85740; X72924; A27282; A27278; A27276; A27270;
 40 A10542; X84700; X56794; Z22924; X81121; X74328; X81120; X82466; X69920; Z22672; Z35761; X62515; X70811;
 X69117; X61157; X77584 X70297; Z11162; X91162; X91164; X91163; X91161; X91160; X91159; X91158; X91157;
 X91165; X91166; X65699; X91156; Z22533; Z22536; Z22535; Z22534; X59684; Z11687; X77533; X62381; X65633;
 X55019; X02508; X02507; X02506; X83956; X66403; X02505; X02504; X02503; X02502; X04759; X01721; X01720;
 X01718; X01717; X01716; X77018; X68487; X68486; X68485; X87197; X81412; X81411; X75299; X94216; X67482;
 45 Z46797; X74039; X51675; X76498; X66029; X66030; X72089; X72018; X69178; X69177; X65181; X65180; X65179;
 X65177; X62156; X57830; Z11166; X91869; X74269; X74270 Z27409; X74764; X59155; X70040; X75071; X86446;
 Z29093; X64123; X64122; X64121; X64120; X64119; X64118; X64117; X64116; X75208; X65178; X94226; X73079;
 X68596; X76079; Z49993; X80022; X80021; X69810; X83688; X77130; X71635; X71445; X66945; X75918; Z32774;
 Z32773; Z32772; X68275; X65176; X65175; X65174; X65173; X65172; X87629; X70108; X67513; X53559; X63131;
 50 X65634; X64878; X84709; X55635; Z25470; X68829; X61615; X86128; Z30428; X30430; X69304; X69303; X69302;
 X69301; X03138; X03137; X03136; X03135; X03134; X03133; X03132 X84348; Z46595; Z38102; Z46596; X59770;
 X77722; X53296; X52015; X64993; X64992; X64991; X64990; X64989; X64988; X64987; X64986; X64985; X64984;
 X64983; X64982; X64981; X64980; X64979; X64974; X64978; X64977; X64976; X64975; X58288; X64995; X64994;
 X17653; X17652; X53364; X64830; X64829; X75897; X52009; X52008; X82068; X58633; X81832; X61656;
 55 XSS037; X63670; Z34260; X68044; Z466Z9; Z46615; Z32633; Z32564; X69878; X68203; X62573; X66187; X62572;
 Z46618; Z46634; X61950; X83863; X83862; X83861; X83860; X83859; X83858; X83857; X83868; X81479; Z28613;
 Z28609; Z28605; Z28602; Z28599; X55758; Z23025 X84076; X63523; X66171; Z23141; X56777; X77155; M31165;
 A31613; A29216; A29103; A28489; A28003; A27284; A27280; A27274; A27272; A21268; A27266; A27264; A27262;
 A27260; A27258; A19671; A19670; A19667; A09781; A09779; A07799; A07801; A07795; L11573; L40625; L34579;
 60 X97058; X96588; X80391; L41690; X89746; X89745; X89743; X89742; X89741; M21574; X94635; X94638; X94637;
 X94636; X94631; X94646; X94645; X94644; X94643; X94642; X94641; X94640; X94639; L40949; X57282; Z66526;
 X89013; X86163; X86165; X86164; L08187; L41147; X84755; L25829; L07746; X86172; X86180; X86173; X86162;
 X86171; X86170; X86168; X86167; X86166; Z69891; L18983; L76224; M73481; M30625; J02960; M15169; L18973;
 M73969; L35233; U35399; L35318; M11730 U33017; L47220; M37722; L09753; L36645; L36644; L36643; L36642;
 65 L31581; L29301; L32831; L32830; M88461; M73747; M73746; M90103; M90102; M98512; M98511; M98510;
 M98508; L32662; L92661; L32660; L07594; M83181; M33602; L37112; L35901; U13666; L35903; L35902; L37362;

5 L35545; L36130; L36150; L36148; L36149; M64749; L35848; L22431; M90366; M76125; L04489; M31163; M75866; M75865; M75864; M85079; L06139; L29349; L29348; M74290; M96738; L13033; L07833; L10126; L10125; J04132; M93221; M93220; M93219; M93218; M93217; M93216; M93215; M93214; M93213; M93212; M93211; M93210; M93209; M93208; M93207; M93206; M93205; M93204; M93203; M93202; M93201; M93200; M93199; M93198; M93197; M93196; M93195; M93194; M93193; M93192; L05198; M15365; M80637; M81778; M81590; M81589; M91455; M97639; M97675; M74721; M89796; L09247; M93426; M88177; L16862; M86528; L07334; L26976; M88107; M76674; M80436; L26079; L07615; L07614; M37981; M73482; M76675; M81797; M32315; M84755; M83246; L27080; M28219; M12626; M93189; M87772; M87771; M87770; L04947; M32972; M32842; M32841; M32840; M32839; M32838; M32837; M32836; M32835; M32834 M32833; M32832; M32831; M32830; M32829; 10 M32828; M32827; M32826; M32825; M32824; M32823; M23100; J05043; M24555; L07782; J03466; L19592; M15864; M68932; L12183; L12182; L12187; L12180; L12179; L12177; L12176; L12178; M96652; M96651; M74782; M84967; M84747; M75128; M64799; M83941; L20814; L09237; L15388; L08176; M64752; L34075; L08485; M93435; M76673; M76672; M64347; M74921; M96995; L06622; M26317; M25785; M91555; M91554; M91553; M91552; M91551; M91550; M63928; M95293; M76724; L09230; M81886; M80776; L25259; M93394; M83712; M97370; M92826; M86841; M91467; M81830; M81829; L20470; L20316; M24853; M80635; L31848; M29066; 15 M85289; L02931; L19058; L20859; M82919; M86868; L14061; M95489; M84562; M97193; M23562; M76595; M77244; M24736; L37361; L37360; K03193; M11234; L06623; M67439; M77250; M77249; M77247; M77248; M33210; M33209; M33208; M83328; M83327; M83326; M83325; M83324; M83554; M97759; M80333; L34339; L17033; L17032; L17031; L17030; L17029; L17028; L13288; M31164; L04270; M58286; L07062; L07061; M73489; 20 L04962; M84426; M84425; M97190; L05521; L05520; L14856; L02911; L05597; L10918; L28824; L04308; L02932; L07592; L29016; L25124; L28175; M84986; M84605; M89473; L12214; L12213; L12212; L12211; M80634; M80638; M80636; M59911; M75914; M73724; M94582; M24559; L03418; M73780; L09732; M83180; M63889; L22607; M82819; L13436; L08177; L07949; L03380; M73832; M64445; L24751; L01406; L08109; L08108; L08107; M69106; M59216; M59215; M59214; M59213; M59212; M11067; M91647; M91646; M91645; L03420; L03419; L08603; 25 M93111; M94915; L12116; M25945; L22303; L23333; L23332; M73238; M63835; M63834; M63833; M63832; M63831; M63830; L13605; L08112; L04473; L00587; L08893; L27594; M28639; M91464; M87290 M26228; M99590; M93415; M74954; L25827; M76446; M89955; M89478; L36162; L05666; L14865; L24894; L24893; L25119; L24804; L21954; L21953; L21952; L21951; L21950; L20817; L20852; L24470; L22214; L23503; L10820; M99293; L01639; L20463; L19872; L17075; L14075; L11695; L22206; M91211; L20469; L11315; L19315; L15310; 30 M99624;

Apéndice II

NM_017882; BI480800; AC096780; AC113243; AF347029; NM_001183; NM_005765; AB028140; NM_002846; NM_002845; NM_002844; NM_002843; NM_002841; NM_130440; NM_130393; NM_130392; NM_130391; NM_002840; NM_006504; NM_130435; NM_002842; NM_002839; BC024191; NM_023068; NM_032646; 35 NM_022006; NM_022003; NM_002127; NM_005516; NM_002121; NM_006120; NM_002116; NM_130797; NM_001936; NM_018593; BM510040; BM509858; BM509717; BM508064; NM_033543; NM_032732; NM_018676; NM_016372; L47337; Y13567; NM_032027; NM_030913; NM_022201; NM_006854; NM_014394; NM_014399; NM_014478; NM_007324; NM_007323; NM_006876; NM_006405; NM_005761; NM_005814; NM_004799; NM_003764; NM_003622; NM_003626; NM_033266; NM_030780; NM_025179; NM_022097; NM_019111; 40 NM_002120; NM_002118; NM_002125; NM_021983; NM_022555; NM_080923; NM_080922; NM_080921; NM_130778; NM_000494; NM_002838; NM_030950; NM_130785; AB057445; NM_006510; NM_033554; NM_005608; BM491907; BM491823; BM491746; BM491722; BM491453; BM490974; BM490515; BM490496; BM490381; BM489618; BM489501; BM489487; BM489466; BM489443; BM489432; BM489389; BM489272; BM489267; BM488196; BM488072; BM487945; BM487175; BM487035; BM486914; NT_009151; NT_010823; 45 XM_008517; NT_009482; NT_009458; NT_005428; XM_087234; NT_030593; XM_092364; NT_025667; NT_010478; NT_010422; NT_030136; XM_090922; XM_085169; NT_026437; XM_085149; NT_025892; NT_019583; XM_093204; NT_025319; NT_011719; XM_093073; XM_060026; NT_011687; NT_011657; XM_032382; XM_055073; XM_009671; NT_011296; NT_011295; NT_011294; NT_011255; NT_011233; X_032285; NT_011151; NT_011109; NT_030157; XM_096100; NT_010672; NT_024776; NT_015360; NT_010552; NT_010356; 50 NT_010351; NT_010224; XM_083914; XM_083903; NT_010036; XM_028295; NT_029430; NT_009967; NT_009952; NT_009917; XM_084974; NT_009910; NT_009711; NT_009540; NT_009487; XM_084852; NT_009471; XM_084845; XM_006748; NT_030809; NT_024394; NT_009237; NT_009215; NT_008992; X_055266; XM_045525; XM_006111; NT_008804; XM_084484; NT_008609; NT_029394; NT_024089; NT_024064; XM_084331; XM_043589; NT_008554; XM_071188; NT_008476; NT_008421; NT_011831; NT_031830; NT_029366; 55 NT_027082; NT_024010; XM_108898; NT_023967; XM_095756; NT_008253; NT_008079; NT_007997; XM_095564; NT_007978; NT_030735; NT_007905; NT_007902; AF132746; NT_007867; NT_007751; NT_031815; NT_031811; XM_095132; NT_031807; NT_030004; NT_027064; NT_017168; NT_007592; XM_094938; XM_094903; XM_094939; NT_007402; XM_069322; XM_087914; XM_087917; XM_094741; NT_025741; NT_023451; XM_069021; NT_006725; XM_094515; NT_006576; XM_004042; XM_087665; NT_006169; 60 NT_022836; XM_093891; AF456925; AF411849; AH011260; X_064062; XM_063875; XM_066655; NT_011519; NT_011362; XM_063355; XM_062544; XM_062443; XM_070446; XM_070130; XM_069635; XM_069633; XM_069470; XM_069460; XM_064220; XM_063652; X_062703; XM_051362; NT_011288; XM_031933; XM_068785; NT_030685; NT_011387; NT_011512; XM_049793; NT_011520; NT_030188; NT_029490; NT_011515; XM_009794; NT_009407; NT_027220; XM_055222; XM_008123; NT_009738; XM_006991;

NT_009513; NT_029317; XM_040419; XM_030300; XM_036570; X_027469 XM_009839; NT_025911; XM_041427;
 XM_006940; NT_011598; XM_033157; XM_044358; XM_004980; XM_002838; XM_005949; XM_035329;
 XM_038156; XM_005346 XM_045505; NT_026472; XM_012718; XM_016506; XM_005187; NT_025803;
 XM_017003; NT_022761; XM_093853; NT_005997; XM_087464; NT_005986; NT_005678; XM_093638;
 5 XM_093637; NT_005654; NT_005616; NT_005543; XM_098155; NT_022531; XM_096181; NT_022412;
 NT_022393; NT_005423; NT_005387; NT_005289; NT_005214; NT_005138; NT_022180; NT_004858; XM_053256;
 NT_004836; NT_004811; XM_041879; NT_004668; NT_004441; NT_004434; NT_004391; NT_021907;
 XM_053163; NM_016155; XM_060507; XM_060501; XM_060442; XM_065294; XM_032249; XM_058189;
 NT_011903; XM_034757; XM_003025; NT_015169; NM_002837; BC022439; NM_005031; NM_021902;
 10 NM_014164; NM_020399; BM439879; BM439852; BM439375; NM_080841; NM_080840; NM_002836; NM_018490;
 NM_006065; NM_004648; NM_003667; BM427439; BM427410; BM427358; NM_002122; NM_080815; NM_080814;
 NM_080813; NM_080812; NM_080811; NM_080810; NM_080809; NM_080808; NM_080807; NM_080806;
 NM_080805; NM_080804; NM_080803; NM_080802; NM_080801; NM_080800; NM_080799; NM_080798;
 NM_005203; NK_008792; NM_080816; NM_018556; AF367761; NM_002124; NM_016235; NM_003105;
 15 NM_004843; AF450008; NM_033056; NM_022349; NM_005438; BC021208; BC021557; BC020870; BC020960;
 AF444779; AF329637; NN_019074; NM_017789; NM_003836; NM_024021; NM_021950; AY046529; AY046528;
 AY028261; AF296875; BM315073; BM314493; BM313985; AF267740; AF350504; AF350503; AF350502;
 AF350501; AF350500; NM_078470; NM_004375; NM_001303; NM_031999; NM_020659; NM_052945;
 NM_078481; NM_001784; NM_004444; NM_004443; NM_004442; NM_017449; BM273281; 461: BM271899;
 20 BM271817; BM271771; BC019314; BM263743; NM_004376; AY062295; NM_078474; NM_025141; NM_078473;
 NM_031940; NM_003728; NM_054027; NM_019847; NM_018440; NM_019894; NM_006577; NM_033252;
 NM_014302; NM_014459; NM_032961; NM_020815; NM_032966; NM_001716; NM_031866; NM_030770;
 NM_001407; NM_001408; NM_005971; NM_021910; NM_021778; NM_021777; NM_021783; NM_020182;
 NM_003857; NM_015727; NM_001058; NM_014246; NM_014265; NM_007264; NM_004733; NM_003801;
 25 NM_007197; NM_001466; NM_006579; NM_006017; NM_005228; NM_004617; NM_004787; NM_004445;
 NM_004338; NM_002982; NM_002944; NM_000264; NM_003508; NM_003507; NM_003506; NM_003468;
 NM_003505; NM_001982; NM_003859; NM_003915; NM_052959; NM_052859; NM_032108; NM_031925;
 NM_030960; NM_030755; NM_024734; NM_023003; NM_021034; NM_006435; NM_016326; NM_016951;
 NM_000888; NM_020241; NM_018407; NM_017514; NM_011893; NM_017599; NM_014254; NM_012339;
 30 NM_012338; NM_002673; NM_006825; NM_004785; NM_004263; NM_004800; NM_000950; NM_003625;
 NM_032518; NM_023945; NM_016158; AK056649; AK056595; AK056648; AK055208; AK054712; AK054646;
 NM_019035; NM_030943; BC018361; AF214006; NM_021201; AF289028; NM_016941; NM_014450; NM_021259;
 NK_002959; NM_000675; BM128846; BM127423; AY016020; M86631; BC011476; NM_000420; BM090614;
 AF217288; AF206516; NM_021153; AY048509; NG_000012; AE006466; AF376725; NM_004776; NM_030587;
 35 NM_003780; NM_002590; L42572; AF106202; NM_033207; AF153440; NM_005086; NM_018153; NM_053034;
 NM_032208; AV225853; AV222771; B017058; BM055437; AF328788; NM_052836; NM_022124; NM_D04063;
 NM_004062; NM_004933; 620: NM_001257; BC009704; BC001496; BC013577; NM_053002; NM_052995
 NM_014879; NM_052891; BI964203; BI963913; AF293372; BC009696; NM_031891 NM_004361; NM_033646;
 AF319952; NM_005756; AF416903; AF416902; AF416901; AF264740; AF264739; AF264738; AH011143;
 40 NM_033467; AF378755; NM_016227; NM_014283; NM_018475; D83783; D79997; D13626; BI793175; U40271;
 BC014554; NM_018916; NM_032407; NM_018929; NM_032406; NM_018928; NM_032101; NM_018927;
 NM_032099 NM_018925; NM_032100; NM_018926; NM_032097; NM_018924; NM_032096; NM_018923;
 NM_032095; NM_018922; NM_032089; NM_018921; NM_032088; NM_014004; NM_032087; NM_D18920;
 NM_032086; NM_018919; NM_032054; NM_018918; NM_032053; NM_018917; NM_032011; NM_032009;
 45 NM_018915; NM_031993; TM_032092; NM_018912; NM_032091; NM_018914; NM_032090; NM_018913;
 NM_031411; NM_031949; NM_031860; NM_031442; NM_007000; NM_003332; AF264747; AF264746; AF264744;
 AH010821; AF264743; AP264742; AF264741; AH010820; AF264737; AF264736; AF264735; AH010829; AF336080;
 AF336079; AH010587; AF336086; AF336085; AH010572; AF336084; AF336083; AH010571; AF336070; AF336069;
 AH010569; AF336068; AF336067; AH010568; AF336082; AF336081; AH010562; AF336078; AF336077; AH010561;
 50 AF336076; AF336075; AH010560; AF336074; AF336073; AH010546; AF336064; AF336063; AH010545; AF336072;
 AF336071; AH010532; AF336066; AF336065; AH010526; NM_022059; NM_000024; AF257472; AJ301609;
 AJ301608; BI713761; BI713497; BI712829; BI712748; BI711750; BI711468; BI711211; BI710795; BC014500;
 BC014443; HC014339; NM_032405; NM_032404; NM_032401; NM_024022; AF325418; AF325419; AH011064;
 NM_022570; AF360695; AH010989; AY035377; AY035376; NM_013317; AJ318099; NM_021808; AF275250;
 55 AF275149; AF275148; AF275147; AF275146; AF275145; AF275144; AF275143; AF275142; AF275141; AF275140;
 AF275139; AF275138; AF275137; AF275136; AF275135; AF275134; AF275133; AF275132; AF275131; AH009676;
 NM_017417; NM_033346; NM_001204; NM_003933; NM_014256; NM_033274; NM_023038; NM_030765;
 AB048207; NM_006005; XM_015722; AY038990; BB226825; AF059274; BC013152; AH011005; AF406650;
 L11671; L11670; BI468287; BI468286

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENITRIX, LLC SEGAL, ANDREW

5 <120> COMPOSICIONES DE LECTINA Y MÉTODOS PARA MODULAR UNA RESPUESTA INMUNITARIA
CONTRA UN ANTÍGENO

<130> 11111/2018

10 <160> 23
<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 11

15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Engarce polipeptídico

20 <400> 1
Arg Ala Arg Asp Pro Arg Val Pro Val Ala Thr
1 ' 5 10

<210> 2
<211> 11

25 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2
cgaaaatttc c 11

30 <210> 3
<211> 148
<212> AND
<213> Artificial

35 <220>
<223> oligonucleótido GTX-5

<400> 3
aattccgcgc cggcacagtg ctcagagaca aactgggtcaa gtgtgagggc atcagcctgc 60
tggctcagaa cacctcgtgg ctgtgtgtgc tctgtctgct cctctccctc ctccaggcca 120
40 cggatttcat gtccctgtga ctgggtac 148

<210> 4
<211> 140
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido GTX-6

50 <400> 4
ccagtcacag ggacatgaaa tccgtggcct ggaggagggg gagggacagc aggagcagca 60
gcagccacga ggtgttctga gccagcaggc tgatgccctc acacttgacc agtttgtctc 120
tgagcactgt gccggcgcgg 140

<210> 5
<211> 50
55 <212> ADN
<213> Artificial

ES 2 441 724 T3

<220>
 <223> Cebador aguas arriba para la amplificación de la secuencia codificante murina de GM-CSF

5 <400> 5
 ccgaattcat gtggtgcag aatttacttt tctgggcat tgtggtctac 50

<210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador aguas abajo para la amplificación de la secuencia codificante murina de GM-CSF

15 <400> 6
 cagccggcct ttggactgg tttttgcat tcaaagggga ttcagtcag 50

<210> 7
 <211> 37
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador aguas arriba para la amplificación de la secuencia señal de modificación GPI de 280 pb de la proteína de levadura Gas1

25 <400> 7
 gtagccggcg ctgactcggg gtctctctcc aagtcta 37

30 <210> 8
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador aguas abajo para la amplificación de la secuencia señal de modificación GPI de 280 pb de la proteína de levadura Gas1

40 <400> 8
 tacgtacc ctaggccaca atgaataag ataccatacc 40

<210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador aguas arriba para la amplificación de pUC19-GMCSF-Gas1.1

50 <400> 9
 tacggccggc acccaccgc tcacc 26

<210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 55 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador aguas abajo para la amplificación de pUC19-GMCSF-Gas1.1

60 <400> 10
 tacggccgcc acaatgaaaa taagatacca t 31

65 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN

ES 2 441 724 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador aguas arriba para la amplificación del GM-CSF humano
 5
 <400> 11
 gcgaatcccg gccggcaccg gcccgctcgc ccagcccc 38
 <210> 12
 10 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador aguas abajo para la amplificación del GM-CSF humano
 <400> 12
 cagccggcct cctggactgg ctcccagcag tc 32
 20 <210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador para la amplificación del vector pUC19
 <400> 13
 30 tacggccggc acccgcccgc tcgccagcc cc 32
 <210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético utilizado para modificar pUC19 GMCSF-Gas1.1
 <400> 14
 40 ccggcactag tggcggaggg ggctccggcg gcgggggagc cg 42
 <210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético utilizado para modificar pUC19 GMCSF-Gas1.1
 50 <400> 15
 ctagcgctgc ccccgccgccc ggcgcccct ccgccactag tg 42
 <210> 16
 <211> 26
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> Cebador HA1 aguas arriba
 <400> 16
 atgctagcga cacaatatgt ataggc 26
 <210> 17
 65 <211> 38
 <212> ADN

ES 2 441 724 T3

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador HA1 aguas abajo		
5	<400> 17 atggtaccgc gccgttatca tctggattga atggacgg	38	
	<210> 18		
	<211> 32		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador aguas arriba para la amplificación de HA-K		
15	<400> 18 ctgaattccg gccggacaca atatgtatag gc 32		
	<210> 19		
	<211> 62		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador aguas abajo para la amplificación de HA-K		
25	<400> 19 atggtaccgc tgcctccgcc gccggagccc cctccgccac ttctggattg aatggacgga	60	
	at	62	
30	<210> 20		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador aguas arriba para la amplificación del fragmento GM-CSF		
	<400> 20 acggtaccgc acccaccgc tcaccatc	29	
40	<210> 21		
	<211> 40		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador aguas abajo para la amplificación del fragmento GM-CSF		
	<400> 21 taggatccgc gccgtcattt ttggactggt ttttgcacg	40	
50	<210> 22		
	<211> 35		
	<212> ADN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador aguas arriba de hGM-CSF		
60	<400> 22 gcgaattccg gccggcacc gcccgctcgc ccagc	35	
	<210> 23		
	<211> 29		

ES 2 441 724 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Cebador aguas abajo de hGM-CSF

<400> 23
tagccggcct cctggactgg ctcccagca

29

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión, comprendiendo dicho polipéptido de fusión
- 5 una lectina que comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de una hemaglutinina del virus de la gripe y puede unirse a una diana que lleva antígeno; y
- al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que puede unirse a una proteína de la superficie celular.
2. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1.
3. Una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1.
- 10 4. Una composición que comprende un polipéptido de fusión, comprendiendo dicho polipéptido de fusión
- una lectina que comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de una hemaglutinina del virus de la gripe y puede unirse a una diana que lleva antígeno; y
- al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que puede unirse a una proteína de la superficie celular.
- 15 5. La composición según la reivindicación 4, que comprende además un antígeno.
6. La composición según la reivindicación 5, en la cual el antígeno es una célula completa que expresa un antígeno, una fracción de célula que comprende un antígeno, una fracción de membrana que comprende un antígeno, un virus que comprende un antígeno o una partícula viral que comprende un antígeno.
- 20 7. La composición según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la cual el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un protozoo y otro antígeno parasítico o un antígeno de tumor.
8. Una composición que comprende
- un antígeno y que comprende además una molécula multifuncional que comprende
- una lectina que comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de una hemaglutinina del virus de la gripe y puede unirse a una diana que lleva antígeno; y
- 25 al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que puede unirse a una proteína de la superficie celular.
- para modular una respuesta inmunitaria en un animal.
9. Una composición que comprende
- 30 un virus o una célula y que comprende además una molécula multifuncional, comprendiendo dicha molécula multifuncional
- una lectina que comprende al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de una hemaglutinina del virus de la gripe y puede unirse a una diana que lleva antígeno; y
- al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos de una molécula de GM-CSF que puede unirse a una proteína de la superficie celular.
- 35 en la cual dicha composición comprende dicha molécula multifuncional unida a dicho virus o dicha célula y comprende además alguno de dicha molécula multifuncional que no está unida a dicho virus o dicha célula
- para modular una respuesta inmunitaria en un animal.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la cual la hemaglutinina del virus de la gripe está seleccionada del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 y H15.
- 40 11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la cual GM-CSF es tanto GM-CSF de ratón como humano.