

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 079**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/566</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/577</b>	(2006.01)
<b>A61P 17/06</b>	(2006.01)	<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/18</b>	(2006.01)	<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)		
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)		
<b>C12P 21/08</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 12168586 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2532681**

54 Título: **Anticuerpo anti-ILT7**

30 Prioridad:

**20.12.2005 JP 2005366465**

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

**05.01.2015**

73 Titular/es:

**SBI BIOTECH CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1 Roppongi, Minato-ku  
Tokyo 106-6018, JP**

72 Inventor/es:

**KAMOGAWA, YUMIKO;  
CHO, MINKWON;  
ARAI, NAOKO y  
ISHIDA, KOJI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 526 079 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

Anticuerpo anti-ILT7

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a ILT7 humano.

10 **Antecedentes de la técnica**

10 El interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ : a continuación en el presente documento, "interferón" se abrevia como IFN) y el interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ) se conocen como IFN tipo 1 que presentan actividad antiviral o actividad antitumoral. Por otro lado, también se ha revelado que IFN $\alpha$  está relacionado con la enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo, se ha notificado la producción anómala de IFN $\alpha$  en pacientes con las siguientes enfermedades autoinmunitarias. También se ha sugerido que los síntomas de las enfermedades autoinmunitarias pueden reducirse mediante la neutralización de IFN $\alpha$ .

Lupus eritematoso sistémico (Shiozawa *et al.*, *Arthr. & Rheum.* 35, 412, 1992)

20 Reumatismo crónico (Hopkins *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 73, 88, 1988)

Se notificaron casos en los que los síntomas de las enfermedades autoinmunitarias se habían manifestado o empeorado mediante la administración de IFN $\alpha$ 2 o IFN recombinantes (Wada *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.* 90, 136, 1995; Perez *et al.*, *Am. J. Hematol.* 49, 365, 1995; Wilson LE *et al.*, *Semin Arthritis. Rheum.* 32, 163-173, 2002.).

25 Además, también se ha revelado que IFN $\alpha$  induce la diferenciación de células dendríticas. La célula dendrítica es también una célula presentadora de antígeno. Por tanto, se considera que la inducción de diferenciación de células dendríticas consiste en un importante mecanismo en enfermedades autoinmunitarias. Se ha sugerido que existe una profunda asociación entre la inducción de diferenciación de células dendríticas de IFN $\alpha$  y la aparición de lupus eritematoso sistémico (Blanco *et al.*, *Science*, 16:294, 1540-1543, 2001). Por tanto, se ha señalado que IFN $\alpha$  está estrechamente relacionado con la actividad antitumoral así como con enfermedades autoinmunitarias. Además, IFN $\alpha$  está profundamente implicado en la aparición de psoriasis (Nestle FO *et al.*, *J. Exp. Med.* 202, 135-143, 2005).

35 Se identificaron células productoras de interferón (IPC) como células que producen IFN tipo 1 en grandes cantidades asociadas con infección viral. Se presentan pocas IPC en la sangre. Se considera que los linfocitos de sangre periférica representan el 1% o menos de las IPC. Sin embargo, las IPC tienen una capacidad muy elevada para producir IFN. La capacidad de producción de IFN de las IPC alcanza, por ejemplo, 3000 pg/ml/10<sup>4</sup> células. Es decir, puede decirse que la mayor parte del IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  en la sangre, que se produce en la infección viral, resulta de las IPC, aunque haya pocas células.

40 Por otro lado, las IPC son células dendríticas linfoides no diferenciadas que se consideran como células precursoras de las células dendríticas. Las IPC pueden denominarse células dendríticas plasmocitoides. Las IPC se diferencian en células dendríticas mediante estimulación viral e inducen la producción de IFN $\gamma$  o IL-10 por células T. Las IPC también se diferencian en células dendríticas mediante la estimulación por IL-3. Las células dendríticas diferenciadas mediante la estimulación por IL-3 inducen la producción de citocina Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) por células T. Por tanto, las IPC tienen propiedades que les permiten diferenciarse en distintas células dendríticas mediante diferente estimulación.

50 Por consiguiente, las IPC tienen dos perfiles: células productoras de IFN y células precursoras de células dendríticas. Ambas células desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario. En otras palabras, IPC es una de las células importantes que soportan el sistema inmunitario en diversos aspectos.

Documento no de patente 1: Shiozawa *et al.*, *Arthr. & Rheum.* 35, 412, 1992

55 Documento no de patente 2: Hopkins *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 73, 88, 1988

Documento no de patente 3: Wada *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.* 90, 136, 1995

Documento no de patente 4: Perez *et al.*, *Am. J. Hematol.* 49, 365, 1995

60 Documento no de patente 5: Bianco *et al.*, *Science*, 16:294, 1540-1543, 2001

Documento no de patente 6: Ju *et al.*, *Gene*. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.

65 Documento no de patente 7: Colonna M *et al.*, *Seminars in Immunology* 12: 121-127, 2000.

Documento no de patente 8: Nakajima H. *et al.*, J. Immunology 162: 5-8. 1999

Documento no de patente 9: Wilson LE *et al.*, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002

Documento no de patente 10: Nestle FO *et al.*, J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005

Documento de patente 1: documento WO03/12061 (solicitud de patente estadounidense publicada n.º 2003-148316)

10 **Descripción de la invención**

*Problemas que debe resolver la invención*

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo que se una al transcrito 7 similar a inmunoglobulina (ILT7), para regular por disminución la actividad de IFN de las IPC.

*Medios para resolver los problemas*

Para regular la actividad de un factor humoral tal como IFN, la administración de anticuerpos, que reconocen el factor, es eficaz. Por ejemplo, se ha realizado el intento de tratar enfermedades autoinmunitarias mediante anticuerpos contra interleucina (IL)-1 o IL-4 (Guler *et al.*, Arthritis Rheum., 44. S307, 2001). Además, se supone que los anticuerpos neutralizantes pueden servir como agentes terapéuticos de enfermedades autoinmunitarias como con el interferón (Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003). Puede predecirse que el mismo enfoque que se describió anteriormente es eficaz con el IFN producido por las IPC. Sin embargo, un enfoque de este tipo se basa en la inhibición del efecto del factor humoral tras la producción del factor. Si la producción del factor humoral deseado puede controlarse directamente, pueden lograrse efectos terapéuticos más sustanciales. Se han notificado anticuerpos, que reconocen IPC humanas. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-BDCA-2 es anticuerpo monoclonal específico de IPC humanas (Dzionic A. *et al.* J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000). Se encuentra que anticuerpo monoclonal anti-BDCA-2 es eficaz en la inhibición de la producción de IFN por IPC humanas (J. Exp. Med. 194: 1823-1834, 2001.). Además, también se ha notificado que anticuerpos monoclonales, que reconocen células productoras de interferón en ratones, inhiben la producción de interferón (Blood 1 de junio de 2004; 103/11: 4201-4206. Epub diciembre de 2003). Se notificó que el número reducido de células dendríticas se debía a anticuerpos monoclonales contra células dendríticas plasmocitoides en ratones (J. Immunol. 2003, 171: 6466-6477).

De manera similar, será útil que se proporcionen anticuerpos que reconozcan IPC humanas y que puedan regular la actividad. Por ejemplo, los presentes inventores han mostrado ya que un anticuerpo, que reconoce Ly49Q, se une específicamente a IPC de ratón. Sin embargo, el anticuerpo contra Ly49Q no interfirió en la actividad de IPC de ratón (Blood, 1 de abril de 2005, Vol. 105, N.º 7 y págs. 2787-2792.; documento WO2004/13325). Por otro lado, ILT7 se conoce como molécula cuya expresión específica se observa en células dendríticas plasmocitoides (Ju XS *et al.* y Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.; documento WO03/12061). Sin embargo, no se ha obtenido ningún anticuerpo contra ILT7. Por tanto, también se desconocen los efectos de los anticuerpos sobre las IPC. ILT7 es una proteína de membrana que contiene un motivo similar a inmunoglobulina. Se ha notificado como una de las moléculas expresadas en células del sistema mieloide o el sistema linfático (Colonna M *et al.*, Seminars in Immunology 12:121-127, 2000.). Una pluralidad de moléculas con estructuras análogas a ILT7 se denomina familia de ILT. La familia de ILT también es estructuralmente similar a los receptores inhibidores de células citotóxicas (KIR). ILT7 tiene cuatro dominios similares a inmunoglobulina tipo C como con otras moléculas de la familia de ILT. Se considera que ILT7 envía señales de activación al interior de la célula como con ILT1, proteína similar a ILT1, ILT8 y LIR6a. Se ha confirmado que una molécula perteneciente a la familia de ILT se expresa en células del sistema hemocítico (Young *et al.*, Immunogenetics 53: 270-278, 2001; "The KIR Gene Cluster. "Carrington, Mary y Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EE.UU.), NCBI; 2003).

Entonces, se detectó una alta expresión de ILT7 en células dendríticas plasmocitoides (PDC) y se detectó una baja expresión de ILT7 en células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) mediante hibridación sustractiva. ILT2 e ILT3 se expresaron no sólo en PDC sino también en DC obtenidas de células positivas para CD34 o MDDC. Sin embargo, puesto que el ARNm en ILT7 se expresó específicamente en PDC, se encontró que el ARNm podría servir como marcador de PDC. Adicionalmente, se encontró que en ese momento, la expresión de ILT7 se reducía por la estimulación de CpG (Ju XS *et al.* Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.; documento WO03/12061).

Los presentes inventores confirmaron que la expresión específica de ILT7 en IPC estaba facilitada a través del estudio sobre IPC humanas. Entonces, los presentes inventores intentaron producir anticuerpos de ILT7 y dilucidar los efectos. Por ejemplo, moléculas que constituyen familias de ILT tales como ILT2 e ILT3 tienen alta conservación, particularmente en secuencias de aminoácidos de dominios extracelulares (figura 9). Estas familias de ILT presentan perfiles de expresión característicos en diversas células sanguíneas, respectivamente. Por tanto, es un objeto muy importante obtener un anticuerpo que pueda distinguir inmunológicamente entre otras moléculas de la familia de ILT e ILT7. Sin embargo, de hecho, fue difícil producir un anticuerpo que se uniese específicamente a IPC humanas

usando ILT7 como inmunógeno debido a los obstáculos descritos a continuación.

5 Generalmente, una proteína producida mediante la tecnología de recombinación génica se usa como inmunógeno para obtener un anticuerpo que reconoce una cantidad traza de proteínas derivadas de organismos vivos. Los presentes inventores intentaron expresar ILT7 humano basándose en información de una secuencia de bases de ADNc de ILT7 humano, que ya se había hallado, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases (n.º de registro GenBank NM012276). Sin embargo, los presentes inventores no pudieron producir ILT7 humano como recombinante en condiciones normales. La secuencia de aminoácidos parcial de la proteína natural se intenta usar a menudo como inmunógeno para obtener un anticuerpo de proteína. Sin embargo, hay pocas secuencias de aminoácidos específicas para ILT7 humano en proteínas puesto que la homología con las secuencias de aminoácidos es extremadamente alta en la familia de ILT. Además, es necesario seleccionar la región constituida por la parte que se reconoce como epítipo por anticuerpos en la superficie de las células con el fin de permitir que anticuerpos reconozcan moléculas en la superficie de las células. Por tanto, se ha considerado que la formación de un anticuerpo que es específico para ILT7 usando una secuencia de aminoácidos fragmento como inmunógeno no es realista.

10 Los presentes inventores mostraron que podía obtenerse un anticuerpo, que se une a las IPC, usando un inmunógeno especial en tales condiciones. Además, los presentes inventores encontraron que el anticuerpo así obtenido reconocía específicamente IPC humanas y además tenía un efecto de regular la actividad y de ese modo tuvieron éxito en completar la presente invención. Es decir, la presente invención se refiere al siguiente anticuerpo anti-ILT7, al método de producción del mismo y al uso del mismo.

#### **Efectos de la invención**

25 La presente invención proporciona un inmunógeno útil en la producción de un anticuerpo que se une a ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano, y suprime la producción de interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) desde células que expresan ILT-7, o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno. Un método de producción de tal anticuerpo anti-ILT7 humano usando el inmunógeno.

30 ILT7 es una proteína de membrana perteneciente a la familia de ILT. Particularmente, la secuencia de aminoácidos de la región extracelular está altamente conservada entre las familias de ILT. Por tanto, es extremadamente difícil producir un anticuerpo que distinga entre las familias de ILT mediante métodos de inmunización generales. Los presentes inventores mostraron que el anticuerpo, que reconoce ILT7 humano, puede obtenerse fácilmente usando células animales en las que ILT7 se coexpresa con proteína de membrana celular. El anticuerpo anti-ILT7, que puede obtenerse mediante la presente invención, tiene una alta especificidad que distingue células que expresan otras familias de ILT de las que expresan IPC humanas.

35 En una realización preferida, el anticuerpo anti-ILT7 humano proporcionado por la presente invención se une a IPC humanas. Además, el anticuerpo de la presente invención reconoce específicamente IPC humanas. Por tanto, es útil en la detección y el aislamiento de IPC. IPC es una célula que produce la mayor parte del interferón tipo 1. Por tanto, la detección y el aislamiento son importantes en el diagnóstico y el estudio de enfermedades que implican IPC tales como enfermedades autoinmunitarias. Particularmente, según los hallazgos de los presentes inventores, la expresión de ILT7 en las IPC no se reduce con la presencia de IFN $\alpha$ . La expresión de IFN $\alpha$  está facilitada a menudo en pacientes con enfermedades autoinmunitarias. Esto significa que el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención puede usarse para la detección y el aislamiento de las IPC con respecto a los pacientes con enfermedades autoinmunitarias en las que la expresión de IFN $\alpha$  está facilitada.

40 El anticuerpo anti-ILT7 proporcionado por la presente invención tiene un efecto que regula la actividad de IPC humanas en una realización preferida. Por tanto, el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención puede usarse para inhibir la actividad de las IPC. Tal como se describió previamente, la expresión de ILT7 en las IPC no se reduce con la presencia de IFN $\alpha$ . Por tanto, si se usa la inhibición de la actividad de las IPC por el anticuerpo de la presente invención, puede esperarse un efecto terapéutico sobre los pacientes con enfermedades autoinmunitarias las en que la expresión de IFN $\alpha$  está facilitada.

45 Escasas IPC producen una gran cantidad de IFN. Son necesarios tantos anticuerpos como moléculas de IFN para la neutralización de IFN. Sin embargo, se inhibe la producción de activación celular directamente en la presente invención. Como resultado, puede esperarse un fuerte efecto inhibitor sobre IFN aunque se use una cantidad menor de anticuerpos en comparación con neutralización por el anticuerpo anti-IFN. Además, en el caso en el que IFN se produce de manera continua, se predice que la neutralización por anticuerpos frente a IFN es una inhibición transitoria. En la presente invención, puesto que se inhibe la actividad de las IPC, puede esperarse el efecto de inhibición de la producción de IFN a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

#### **Breve descripción de los dibujos**

65 La figura 1a es una fotografía en la que se examina la expresión de ARNm del gen de ILT7 mediante un método de

RT-PCR. Es el resultado de la expresión analizada de ARNm del gen de ILT7 en inmunocitos humanos.

La figura 1b es un diagrama en el que la expresión de ARNm del gen de ILT7 en diversos tejidos y células humanos se compara y examina usando un método de PCR cuantitativa. El eje horizontal muestra los tejidos y células examinados y el eje vertical muestra el nivel de expresión de ILT7, que se normaliza según el nivel de expresión del gen de GAPDH.

La figura 2 es un diagrama que muestra estructuras de proteína ILT7, en el que la figura 2(a) muestra una secuencia de aminoácidos de proteína ILT7 y muestra además la secuencia señal de secreción estimada y el dominio transmembrana en el dibujo, y la figura 2(b) muestra un diagrama esquemático de proteínas ILT7 que están codificadas por vectores de expresión construidos.

La figura 3 es un diagrama que muestra el resultado de que se introdujeran el vector de expresión de ILT7 y el vector de expresión de FcRy en células y se examinó la expresión en la superficie celular de moléculas de ILT7 mediante FCM. El eje horizontal muestra la intensidad de fluorescencia detectada en anticuerpo anti-FLAG, concretamente, la intensidad de la expresión en la superficie celular de moléculas de ILT7 a las que se les unió una etiqueta FLAG y el eje vertical muestra el número de células.

La figura 4 muestra fotografías en las que se analizó la introducción del vector de expresión de ILT7 y el vector de expresión de FcRy en células y la asociación de moléculas mediante inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western. Los diagramas en el lado izquierdo muestran los resultados de que se sometió a inmunotransferencia molécula de ILT7 con anticuerpo anti-FLAG tras la inmunoprecipitación de molécula de FcRy con anticuerpo anti-myc (el dibujo superior) y se sometió a inmunotransferencia molécula de FcRy con anticuerpo anti-myc (el dibujo inferior). De manera similar, los diagramas en el lado derecho muestran los resultados de que se sometió a inmunotransferencia molécula de ILT7 con anticuerpo anti-FLAG tras la inmunoprecipitación de molécula de FcRy con anticuerpo anti-FLAG (parte superior) y se sometió a inmunotransferencia molécula de FcRy con anticuerpo anti-myc (parte inferior).

La figura 5 es una fotografía en la que se examinó la glicosilación de molécula de ILT7 mediante la introducción de vector de expresión de ILT7 y vector de expresión de FcRy en la célula y tratamiento con N-glicosidasa. El lado izquierdo de la fotografía muestra el tamaño de ILT7 en el caso en el que ILT7 no se trató con N-glicosidasa y el lado derecho de la fotografía muestra el tamaño de ILT7 en el caso en el que se realizó el tratamiento con N-glicosidasa.

La figura 6a es un diagrama en el que se examinó la capacidad de respuesta del anticuerpo monoclonal anti-ILT7 producido mediante análisis de FCM. (a) muestra el resultado de que se analizó la unión del anticuerpo anti-ILT7 a la fracción de IPC de positivas para BDCA-2 usando linfocitos de sangre periférica humanos y doble tinción con el anticuerpo anti-ILT7 y el anticuerpo anti-BDCA-2. El eje vertical muestra la capacidad de respuesta frente al anticuerpo frente a BDCA-2 y el eje horizontal muestra la capacidad de respuesta frente a cada uno de los anticuerpos anti-ILT7 producidos.

La figura 6b es un diagrama en el que se examinó la capacidad de respuesta de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos mediante análisis de FCM. (b) muestra el resultado en el que se examinó la unión del anticuerpo anti-ILT7 a molécula de ILT7 usando células 293T en las que se habían introducido los vectores de expresión de ILT7 y de FcRy. El eje vertical muestra la capacidad de respuesta de anticuerpo anti-FLAG, concretamente, la intensidad de expresión de moléculas de ILT7 a las que se les unió una etiqueta FLAG y el eje horizontal muestra la capacidad de respuesta de anticuerpos anti-ILT7 respectivos.

La figura 7 es un diagrama en el que entre los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos, se examinó la capacidad de respuesta de dos clones frente a linfocitos de sangre periférica humanos mediante análisis de FCM. Tres gráficos a la izquierda muestran los resultados de #11 y tres gráficos a la derecha muestran los resultados de #17. En los diagramas en el lado izquierdo, cada eje con la marca de ILT7 muestra la capacidad de respuesta de ILT7#11. De manera similar, en los diagramas en el lado derecho, cada eje con la marca de ILT7 muestra la capacidad de respuesta de ILT7#17.

La figura 8 es el resultado en el que se comparó la actividad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 ILT7#11 e ILT7#17 producidos frente a linfocitos humanos con la del anticuerpo anti-BDCA-2 y se examinó. El eje vertical muestra la capacidad de respuesta del anticuerpo anti-CD123 y el eje horizontal muestra la capacidad de respuesta de cada anticuerpo. Es decir, cada anticuerpo se une a una parte de célula positiva para CD123. Es un diagrama que muestra los resultados en los que se analizó la capacidad de respuesta cuando se estimularon células linfocíticas mediante dos clases de CpG e IFN $\alpha$ .

La figura 9a es un diagrama que muestra secuencias de aminoácidos de moléculas de la familia con alta homología con moléculas de ILT7. Cada secuencia de aminoácidos de la región extracelular se muestra principalmente como una alineación;

La figura 9b es una continuación de la figura 9a; y la figura 9c es una continuación de la figura 9b.

- 5 La figura 10 es el resultado en el que se examinó la capacidad de respuesta de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 ILT7#11 e ILT7#17 producidos frente a moléculas de ILT1, ILT2 e ILT3 usando células en las que se introdujeron sus vectores de expresión. El diagrama superior muestra los resultados en los que se reafirmó la capacidad de respuesta frente a células en las que se habían coexpresado moléculas de ILT7 con una etiqueta FLAG, con FcR $\gamma$ . El diagrama inferior muestra los resultados en los que la capacidad de respuesta frente a células en las que se introdujeron ILT1, ILT2, ILT3 y FcR $\gamma$  (diagrama izquierdo: ILT7#11, diagrama derecho: ILT7#17). El eje horizontal muestra la capacidad de respuesta de cada anticuerpo anti-ILT7.
- 10 La figura 11 es un diagrama que muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 ILT7#11 e ILT7#17 producidos sobre la capacidad interferogénica de linfocitos humanos. En el diagrama, el eje horizontal muestra la concentración de IFN $\alpha$  en un sobrenadante de cultivo cuando se estimularon linfocitos humanos mediante virus Influenza y el eje vertical muestra los anticuerpos tratados. El término "sin infecciones" indica los resultados de células que no se estimularon mediante virus Influenza.
- 15 La figura 12 es un diagrama que muestra la actividad de CDC de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 ILT7#37, ILT7#28 e ILT7#33 producidos. Incluso cuando se usaron los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 obtenidos a partir de cualquier hibridoma, se mostró el 80% o más de la actividad de CDC a la concentración de anticuerpo de 0,1  $\mu$ g/ml o mayor. En el caso de anticuerpos distintos del anticuerpo monoclonal anti-ILT7, no se observó la actividad de CDC frente a células diana.
- 20 La figura 13 es un diagrama que muestra la internalización frente a células diana de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 ILT7#17, ILT7#26, ILT7#37, ILT7#28 e ILT7#33 producidos.
- 25 La intensidad de fluorescencia de APC es un indicador de la cantidad del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que estaba presente en la superficie de las células antes de la incubación y se detecta independientemente de si el complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 está presente en la superficie de la célula diana o se incorpora en la célula tras la incubación. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia de FITC es un indicador de la cantidad del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que permanece en la superficie de las células tras la incubación.
- 30 Es decir, la intensidad de fluorescencia de FITC disminuye mediante internalización.
- 35 Se ha notificado que ILT7 (transcrito 7 similar a inmunoglobulina) humano es una molécula que se expresa específicamente en células dendríticas plasmocitoides (Gene. 28 de abril de 2004; 331:1 59-64.; documento WO03/12061). Alternativamente, también se sabe que ILT7 humano puede usarse como indicador predictivo para el pronóstico de linfoma (documento WO2005/24043). Sin embargo, no se ha establecido un método para producir un anticuerpo que pueda reconocer ILT7 humano.
- 40 ILT7 humano consiste en 499 residuos de aminoácido tal como se muestra en SEQ ID NO: 2 y es una proteína transmembrana tipo 1 que comprende cuatro dominios similares a inmunoglobulina en la estructura y una región transmembrana (445-466; desde 429 hasta 450 en SEQ ID NO: 2). Entre los 444 residuos de aminoácido incluyendo el extremo N-terminal, 16 residuos de aminoácido (desde -15 hasta -1, en SEQ ID NO: 2) son secuencias señal y 17 a 444 residuos de aminoácido (desde 1 hasta 428, en SEQ ID NO: 2) constituyen un dominio extracelular. Por otro lado, la región C-terminal es un dominio intracelular. La mayor parte de las partes del ILT7 humano son dominios extracelulares y 33 residuos de aminoácido constituyen un dominio intracelular (desde 467 hasta 499; desde 451 hasta 483, en SEQ ID NO: 2). No se predice que un motivo, que está implicado en la señalización, esté presente en un dominio intracelular. Una secuencia de aminoácidos de longitud completa de ILT7 humano se muestra en SEQ ID NO: 2 y una secuencia de bases de ADNc que codifica para la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 1. En este caso, las regiones codificantes del péptido maduro (72)..(1520), mostradas en SEQ ID NO: 1, no comprenden los codones de terminación e iniciación. Es decir, las secuencias codificantes de proteína que comprenden los codones de terminación e iniciación en SEQ ID NO: 1 son desde 24 hasta 1523.
- 45
- 50
- 55 Se considera que la señal de ligando se transmite a las células mediante la asociación de ILT7 humano con una molécula de transducción de señales. Por ejemplo, la mayor parte de las cadenas  $\gamma$  del receptor de Fc están presentes en células. Además, el dominio intracelular contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) que está implicado en la señalización. ITAM es una parte de secuencia de aminoácidos, que se observa comúnmente en moléculas adaptadoras que están asociadas con inmunorreceptores tales como receptores de Fc. Un motivo tal como YxxL (SEQ ID NO: 76), que es una diana de la fosforilación de tirosinas, está comprendido en ITAM y se transmite la señal mediante la fosforilación. Los ejemplos conocidos de la molécula de transducción de señales, que comprende ITAM en un dominio intracelular, incluyen CD3 $\zeta$  y DAP12 además de la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc. Entre estas moléculas de transducción de señales, se predice que la molécula asociada con ILT7 humano es la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc. Actualmente, no se ha encontrado un ligando, que se una a ILT7 humano.
- 60
- 65 Los presentes inventores confirmaron que ILT7 se expresaba específicamente en IPC humanas mediante análisis de la expresión génica. Los presentes inventores consideraron que sería útil en el estudio de las IPC que pudiera

5 obtenerse un anticuerpo que pueda distinguir ILT7 humano de otras moléculas de manera inmunológica. Sin embargo, existen muchas moléculas con estructuras similares en la familia de ILT incluyendo ILT7. Moléculas tales como ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, o LIR-8 comprenden secuencias de aminoácidos altamente homólogas, particularmente en sus dominios extracelulares. Por tanto, los presentes inventores consideraron que era difícil  
 10 obtener un anticuerpo que pueda distinguir entre estas moléculas usando un péptido de dominio que comprende una secuencia de aminoácidos parcial que constituye un dominio extracelular como inmunógeno. Entonces, los presentes inventores han intentado producir un anticuerpo contra ILT7 humano usando las células que expresan ILT7 humano como inmunógenos.

10 Sin embargo, el uso de vectores de expresión generales no provocó la expresión de ADNc de ILT7 humano en células animales. Se ha notificado que la molécula de ILT1 que tiene una estructura muy similar a ILT7 se asocia con la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc. Es decir, cuando se usaron células en las que se expresó la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc tales como células RBL (leucemia basófila de rata) y células P815 (mastocitoma de ratón) como células huésped, se observó la expresión de ILT1 en la superficie celular. Sin embargo, si se forzaba que se expresase ILT1 en células 293 en las que no se expresaba originariamente la cadena del receptor de Fc, no se observaba la expresión en la superficie celular. Por otro lado, se mostró que la expresión en la superficie celular de ILT1 pudo confirmarse cuando se coexpresó ILT1 con la cadena del receptor de Fc (Nakajima H. *et al.*, J. Immunology 162:5-8,1999). Sin embargo, no existe información sobre un inmunógeno para producir anticuerpos frente a ILT7.

20 Por ejemplo, en el informe, se usan células RBL en las que se introduce el gen de ILT1 como inmunógenos para producir anticuerpos frente a ILT1. Los presentes inventores intentaron producir anticuerpos frente a ILT1 usando la combinación de células RBL con el gen de ILT7 de la misma manera que se ha descrito. Sin embargo, aunque se forzase que se expresara ILT7 en células RBL (P815), no se observó expresión en la superficie celular de ILT7, y por tanto no pudo usarse como inmunógeno.

25 Los presentes inventores han realizado una investigación dedicada para obtener el anticuerpo que pueda reconocer ILT7 humano. Como resultado, los presentes inventores encontraron que podía producirse el anticuerpo deseado usando una célula transformada específica como inmunógeno y completaron la presente invención. Es decir, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que se une a un anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano, y suprime la producción de interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) desde células que expresan ILT-7, o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno.

30 En la presente invención, ILT7 humano puede definirse como una molécula natural que se expresa en IPC humanas o una molécula que es inmunológicamente equivalente a ILT7 que se expresa en IPC humanas. En la presente invención, la unión de anticuerpos a ILT7 humano puede confirmarse, por ejemplo, tal como sigue.

35 Confirmación basándose en la capacidad de respuesta frente a células humanas:

40 Según los hallazgos de los presentes inventores, la expresión específica de ILT7 humano se observó en IPC humanas. Originariamente, se aisló ILT7 humano como un gen cuya expresión se observa en células dendríticas plasmocitoides (Blood. 2002 100; 3295-3303, Gene. 28 de abril de 2004; 331:159-64.). Además, también se sabe que puede usarse como marcador de células dendríticas plasmocitoides (documento WO03/12061). Se supone que las células dendríticas plasmocitoides y las IPC son en su mayor parte poblaciones celulares idénticas o grandes partes de las mismas son comunes. Por tanto, no existe contradicción entre estos informes y los hallazgos de los presentes inventores.

45 Considerando tal perfil de expresión de ILT7 humano, en primer lugar, la actividad de unión de IPC o células dendríticas plasmocitoides a al menos un determinado subconjunto es una de las características importantes del anticuerpo que se une a ILT humano en la presente invención. Pueden usarse marcadores de superficie celular específicos para poblaciones celulares respectivas para determinar si una determinada célula es IPC o célula dendrítica plasmocitoide. Por ejemplo, la unión a las células deseadas puede confirmarse mediante tinción doble con el anticuerpo que se une a marcadores de superficie celular y el anticuerpo cuya actividad de unión debe comprobarse. Es decir, las IPC en la presente invención comprenden, por ejemplo, células que expresan BDCA2.

50 Confirmación basándose en la capacidad de respuesta frente a células transformadas que expresan el gen de ILT7 humano:

55 Los presentes inventores encontraron que se reconstruía una característica inmunológica de ILT7 expresado en IPC humanas cuando se llevaba a cabo la expresión del gen de ILT7 humano en una condición específica. Por tanto, la capacidad de respuesta frente a ILT7 humano también puede confirmarse basándose en la capacidad de respuesta de anticuerpos frente a células en las que se introduce de manera artificial un gen que codifica para ILT7. Concretamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende la secuencia de aminoácidos que constituye un dominio extracelular como el dominio extracelular y se une a una molécula coexpresada con la molécula de transducción de señales o se refiere a un fragmento que comprende su región de unión a antígeno. En este caso, el dominio extracelular se compone de una secuencia de aminoácidos que  
 60  
 65

corresponde a la posición 17<sup>a</sup> a 444<sup>a</sup> de la secuencia de aminoácidos N-terminal mostrada en SEQ ID NO: 2 (desde 1 hasta 428 en SEQ ID NO: 2).

5 Por ejemplo, la característica inmunológica de ILT7 expresada en IPC humanas se mantiene en células cotransfectadas con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica para ILT7 humano y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica para la molécula de transducción de señales. Por tanto, una célula transformada, que coexpresa ILT7 humano y la molécula de transducción de señales, es preferible para confirmar la afinidad de unión de anticuerpos al dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención. En la presente invención, es deseable usar una célula, que no está transformada como controles cuando la capacidad de respuesta de anticuerpos, se confirma usando la célula transformada. Además, también es importante confirmar que la unión de anticuerpos no se detecta usando la misma célula huésped que expresa sólo la molécula de transducción de señales como control.

15 En la presente invención, una molécula, que induce la expresión de ILT7 humano en la superficie celular, puede usarse como la molécula de transducción de señales para la coexpresión. La molécula de transducción de señales en la presente invención también puede definirse como una molécula que puede conferir la característica inmunológica de ILT7 humano natural a al menos el dominio extracelular de la molécula de ILT7 en una célula que expresa ILT7. Tal como se usa en el presente documento, el término "característica inmunológica" de ILT7 humano natural significa el reconocimiento por un anticuerpo que se une a IPC humanas.

20 Específicamente, es preferible usar la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc o DAP12 como molécula de transducción de señales. En la presente invención, la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc es particularmente preferible como la molécula de transducción de señales. La cadena  $\gamma$  del receptor de Fc es una molécula que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16. La molécula de transducción de señales puede ser un fragmento siempre que el ILT7 humano que va a coexpresarse se localice en la superficie celular. Siempre que el ILT7 humano que va a coexpresarse se localice en la superficie celular, se permite la mutación o adición de la secuencia de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16. Es decir, la presente invención proporciona métodos para producir células que producen un anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano, y suprime la producción de interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) desde células que expresan ILT-7, o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno, que comprende las siguientes etapas de:

30 (1) administrar a un animal no humano una célula que conserva los siguientes puntos (a) y (b) de manera expresable:

35 a. un polinucleótido exógeno que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular de ILT7 humano; y

40 b. un polinucleótido exógeno que codifica para la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc (FcR $\gamma$ ); y

(2) producir y seleccionar una célula productora de anticuerpos que produce el anticuerpo que se une a ILT7 humano de células productoras de anticuerpos del animal no humano; y

45 (3) cultivar la célula así seleccionada y recuperar un anticuerpo monoclonal del cultivo.

Posteriormente, como el anticuerpo que se une a ILT7 humano en la presente invención, es preferible usar un anticuerpo en el que no se observa cruzamiento con poblaciones celulares que se sabe que expresan las familias de ILT distintas de ILT7. Específicamente, como el anticuerpo que se une a ILT7 humano en la presente invención, es preferible usar un anticuerpo en el que no puede observarse la unión a las poblaciones celulares que se sabe que expresan las familias de ILT distintas de ILT7, en la misma condición que la condición en la que se confirmó la unión a las IPC. Tal como se describió ya, por ejemplo, ILT2 e ILT3 se expresan no sólo en PDC sino también en DC obtenidas de células positivas para CD34 o MDDC (Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.). Por otro lado, la expresión de ILT7 no puede detectarse debido a la diferenciación de las IPC en células dendríticas. Por tanto, el anticuerpo no puede detectar la unión a DC obtenidas de células positivas para CD34 o MDDC en la condición en la que puede confirmarse que la unión a las IPC está comprendida en el anticuerpo que se une a ILT7 humano en la presente invención.

50 Se han notificado los siguientes patrones de expresión en cuanto a otras moléculas de la familia de ILT ("The KIR Gene Cluster" Carrington, Mary y Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EE.UU.), NCBI; 2003, Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.). Por tanto, un anticuerpo que se une a IPC humanas o PDC y cuya unión a las siguientes células no puede confirmarse se incluye en un anticuerpo que tiene especificidad para ILT7:

55 ILT1; células del linaje mielóide (monocitos, DC derivadas de monocitos, macrófagos);

65 ILT2; PDC, células B, células positivas para CD34, DC derivadas de células positivas para CD34 y DC derivadas de

monocitos;

ILT3; PDC y DC;

5 ILT5; monocitos, DC derivadas de células positivas para CD34 y DC derivadas de monocitos; e  
ILT8; células del linaje de monocitos.

10 Es decir, el anticuerpo monoclonal, que se une al dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención preferiblemente, comprende un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

a) el anticuerpo monoclonal se une a IPC humanas; y

15 b) la unión del anticuerpo monoclonal a una o más células seleccionadas del grupo que consiste en monocitos, macrófagos, células B, células positivas para CD34 y células dendríticas derivadas de estas células no puede confirmarse en la condición para la unión a IPC humanas.

20 Como el anticuerpo monoclonal de la presente invención, es preferible usar un anticuerpo en el que la unión a monocitos, macrófagos, células B, células positivas para CD34 y células dendríticas derivadas de estas células no puede confirmarse en la condición para la unión, particularmente a IPC humanas.

25 Alternativamente, el anticuerpo monoclonal, que se une al dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención, comprende preferiblemente un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

c) el anticuerpo monoclonal se une a la célula transformada que se cotransfecta con un vector de expresión que porta de manera expresiva el ADN que codifica para ILT7 humano y un vector de expresión que porta de manera expresiva el ADN que codifica para la molécula de transducción de señales;

30 d) la unión a la célula huésped antes de la transformación no puede confirmarse en la condición para la unión a las células cotransfectadas tal como se describe en c); o

el anticuerpo monoclonal de la presente invención comprende un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

35 e) la unión a la célula huésped que expresa sólo la molécula de transducción de señales no puede confirmarse en la condición para la unión a las células cotransfectadas tal como se describe en c).

40 En la presente invención, el hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 no se cruce con la familia de ILT de otras moléculas puede confirmarse usando células en las que se forzó que se expresase cada familia de ILT. Es decir, para la expresión forzada, se introduce ADNc que codifica para cada familia de ILT de secuencias de aminoácidos en una célula huésped apropiada. El anticuerpo monoclonal anti-ILT7 cuyo cruzamiento debe confirmarse se pone en contacto con la célula transformada obtenida. Entonces, puede confirmarse que si no se observa la unión del anticuerpo a la célula, que expresa moléculas de la familia de ILT distintas a ILT7, el anticuerpo puede distinguir inmunológicamente entre ILT7 y otras moléculas de la familia de ILT. Por ejemplo, en los ejemplos descritos a continuación, se confirma el hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 obtenido mediante la presente invención no se cruza con ILT1, ILT2 e ILT3. Por tanto, un ejemplo preferible del anticuerpo monoclonal en la presente invención es el anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 en el que la unión a ILT1, ILT2 e ILT3 no puede detectarse en la misma condición.

50 Particularmente, ILT2 e ILT3 son genes cuya expresión en las IPC se ha confirmado (Ju *et al.* Gene 331, 159-164, 2004). Sin embargo, estas moléculas pueden mostrar perfiles de expresión únicos para cada tipo celular dependiendo de los niveles de diferenciación respectivos en las IPC o condiciones tales como la estimulación con virus u otras citocinas. El uso de un anticuerpo, que puede distinguir inmunológicamente estas moléculas de la familia de ILT de ILT7, permite detectar específicamente cambios en la expresión de ILT7.

60 La unión de un anticuerpo monoclonal cuya actividad de unión debe confirmarse a diversas clases de células, puede confirmarse basándose en, por ejemplo, el principio de la citometría de flujo. Para confirmar la capacidad de respuesta de anticuerpos basándose en el principio de la citometría de flujo, es ventajoso marcar por adelantado los anticuerpos con una molécula o un grupo atómico que produzca una señal detectable. Generalmente, se usan los marcadores fluorescentes o luminiscentes. Puede usarse un separador de células activado por fluorescencia (FACS) para analizar la unión de los anticuerpos marcados de manera fluorescente a células basándose en el principio de la citometría de flujo. El uso de FACS permite confirmar de manera eficaz la unión de una pluralidad de anticuerpos a una pluralidad de células.

65 Específicamente, por ejemplo, se hacen reaccionar el anticuerpo A que se ha encontrado previamente que puede

identificar las IPC y el anticuerpo B cuyas características de unión a IPC deben analizarse, con poblaciones celulares que comprenden las IPC al mismo tiempo. El anticuerpo A y el anticuerpo B se marcan por adelantado con una señal de fluorescencia que se distingue mutuamente por estos anticuerpos. En el caso en el que ambas señales se detectan a partir de las mismas poblaciones celulares, puede confirmarse la unión de esos anticuerpos a las mismas poblaciones celulares. En otras palabras, se encuentra que ambos anticuerpos A y B tienen las mismas características de unión. En el caso en el que se unen a diferentes poblaciones celulares, está claro que ambos anticuerpos tienen distintas características de unión.

Un ejemplo preferible del anticuerpo monoclonal en la presente invención puede comprender un anticuerpo monoclonal que se produce por el hibridoma ILT7#11 o ILT7#17. El hibridoma ILT7#11 y el hibridoma ILT7#17 se han depositado ante el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Autoridad Depositaria Internacional de Organismos de Patentes con los n.ºs de registro FERM BP-10704 y FERM BP-10705 el 21 de octubre de 2005.

El contenido del depositario especificado es tal como sigue:

(a) Denominación y dirección de la institución depositaria, denominación: Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Autoridad Depositaria Internacional de Organismos de Patentes, dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón (código postal 305-8566)

(b) Fecha de depósito: 21 de octubre de 2005

(c) Número de registro: FERM BP-10704 (hibridoma ILT7#11)

(c) Número de registro: FERM BP-10705 (hibridoma ILT7#17)

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede ser un fragmento que comprende su región de unión a antígeno. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno que se obtiene mediante digestión enzimática de IgG puede usarse como el anticuerpo en la presente invención. Específicamente, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo tales como Fab y  $F(ab')_2$  mediante digestión con papaína o pepsina. Se sabe bien que estos fragmentos de anticuerpo pueden usarse como moléculas de anticuerpo que tienen afinidad por los anticuerpos. Alternativamente, también pueden usarse anticuerpos contruidos mediante recombinación genética siempre que se mantenga una actividad de unión a antígeno satisfactoria. Los ejemplos de los anticuerpos contruidos mediante recombinación genética comprenden anticuerpos quiméricos, anticuerpos trasplantados con CDR, Fv de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos poliespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. Es de conocimiento común que estos anticuerpos pueden proporcionarse usando anticuerpos monoclonales o células productoras de anticuerpos que producen los anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede obtenerse usando una célula transformada específica como inmunógeno. Es decir, la presente invención se refiere a un método para producir células que producen un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano, que comprende las siguientes etapas de:

(1) administrar una célula que expresa una proteína exógena que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano y una molécula exógena que está asociada con ILT7 humano a animales inmunes; y

(2) seleccionar una célula productora de anticuerpos que produce el anticuerpo que se une a ILT7 humano de células productoras de anticuerpos de los animales inmunes.

Las células productoras de anticuerpos así obtenidas o las células productoras de anticuerpos inmortalizadas se cultivan y los anticuerpos monoclonales deseados pueden recuperarse de los cultivos. Con referencia al método para inmortalizar células productoras de anticuerpos, se conocen diversos métodos.

En el método para producir el anticuerpo monoclonal de la presente invención, los ejemplos que pueden usarse de la molécula, que está asociada con ILT7 humano para producir una célula transformada que va a usarse como inmunógeno, comprenden proteínas de membrana celular. Entre ellas, es preferible usar una molécula de transducción de señales, que se localiza en membranas celulares, como proteína de membrana celular en la presente invención. El término "molécula de transducción de señales" significa una molécula que está asociada con proteínas y células que tienen estructuras receptoras en el dominio extracelular y transmite la estimulación de la unión de ligandos a receptores en células. Los ejemplos de la molécula de transducción de señales comprenden la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc, DAP12, o similar. Por ejemplo, es preferible usar la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc como proteína de membrana celular en la presente invención. Se conocen de manera pública secuencias de aminoácidos de DAP12 humano y la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc así como una secuencia de bases de ADNc, que codifica para las secuencias. Una secuencia de bases de la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc humano y una secuencia de aminoácidos que está codificada por la secuencia de bases se muestran en SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

En la presente invención, una célula transformada que va a usarse como inmunógeno puede obtenerse mediante la

preparación, por ejemplo, de una célula que porta de manera expresiva los siguientes puntos (a) y (b):

(a) un polinucleótido exógeno que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular de ILT7 humano; y

(b) un polinucleótido exógeno que codifica para la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc.

En la presente invención, un polinucleótido exógeno significa un polinucleótido que se introduce de manera artificial en una célula huésped. Cuando se usan células humanas como células, se introducen genes humanos en células humanas. En una combinación de este tipo, un polinucleótido introducido de manera artificial significa el polinucleótido exógeno. Por tanto, la expresión ectópica de ILT7 humano o la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc humano está comprendida en la expresión del polinucleótido exógeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio extracelular de ILT7 humano” significa la secuencia de aminoácidos desde la posición 17<sup>a</sup> hasta la 444<sup>a</sup> de la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2 que corresponde al dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos (desde 1 hasta 428 en SEQ ID NO: 2). Como secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención, es preferible usar la secuencia de aminoácidos que comprende cada región, por ejemplo, partiendo desde el extremo N-terminal, en el orden siguiente:

[Secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana + región intracelular]

Alternativamente, una secuencia de aminoácidos, que carece parcialmente de una región intracelular tal como se describe a continuación, está incluida en la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención.

[Secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana + una parte de la región intracelular]

Además, una estructura, que carece de una región intracelular tal como se menciona a continuación, está incluida en la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención.

[Secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana]

En la estructura, las regiones distintas al dominio extracelular pueden ser secuencias de aminoácidos que se seleccionan de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, o pueden combinarse con otras secuencias de aminoácidos que tienen homología con las regiones. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que constituye una secuencia señal, un dominio transmembrana y una región intracelular puede ser una secuencia de aminoácidos de moléculas de la familia de ILT distintas de ILT7. O bien, puede combinarse con la secuencia de aminoácidos de la familia de ILT en especies distintas al ser humano. Además, la secuencia de aminoácidos, que constituye regiones distintas del dominio extracelular, puede comprender una mutación en el intervalo que puede mantener la función de cada región. Alternativamente, otras regiones pueden ser intermedias entre cada región. Por ejemplo, una etiqueta de epítipo tal como FLAG también puede insertarse entre la secuencia señal y el dominio extracelular. Particularmente, la secuencia señal se elimina por el procesamiento durante su transferencia a la superficie de la membrana celular tras traducirse para dar una proteína. Por tanto, puede usarse una secuencia de aminoácidos arbitraria, que induce el tránsito de la proteína traducida a la membrana celular, como la secuencia señal. Más específicamente, es preferible usar la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de ILT7 humano como la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano.

Por tanto, en la presente invención, puede usarse una secuencia de bases arbitraria que codifica para la secuencia de aminoácidos que constituye la estructura mencionada anteriormente [secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana + región intracelular] como el polinucleótido que constituye el polinucleótido exógeno descrito en (a). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 está codificada por la secuencia de bases descrita en SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, un vector de expresión que porta de manera expresiva los polinucleótidos (a) y (b) mencionados anteriormente puede introducirse en una célula huésped apropiada para obtener una célula transformada que va a usarse como inmunógeno. Los polinucleótidos (a) y (b) pueden portarse en un vector o diferentes vectores. Cuando cada polinucleótido se porta en diferentes vectores, las células huésped se cotransfectan con dos clases de vectores.

Los ejemplos preferibles de la célula huésped en la presente invención comprenden células de mamífero. Los ejemplos específicos de la célula huésped comprenden células derivadas de seres humanos, monos, ratones o ratas. Particularmente, las células derivadas de seres humanos son preferibles como células huésped. Por ejemplo, es preferible usar células 293T derivadas de ser humano como la célula huésped en la presente invención. Pueden obtenerse células 293T como ATCC CRL-11268. Además, también pueden usarse células derivadas de animales inmunes como células huésped. Cuando se usan células derivadas de animales inmunes como inmunógenos, se

proporciona una pequeña respuesta inmunológica frente a células huésped. Por ese motivo, puede obtenerse de manera eficaz un anticuerpo contra el dominio extracelular de ILT7 expresado de manera endógena. Por tanto, por ejemplo, cuando se usan ratones como animales inmunes, también pueden usarse células derivadas de ratones como células huésped.

5 Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden transformarse en células portándolos en un vector que puede inducir expresión en células huésped. Pueden usarse vectores disponibles comercialmente, que pueden inducir la expresión en células de mamífero. Pueden usarse vectores de expresión tales como el vector pCMV-Script (R), el vector PSG5 (fabricado por Stratagene), pADNc3.1 (fabricado por Invitrogen) para la presente invención.

10 Las células transformadas así obtenidas se administran a animales inmunes junto con componentes adicionales tales como adyuvantes, si es necesario. Los ejemplos del adyuvante que pueden usarse incluyen adyuvante completo de Freund, y similares. En caso de usar ratones como animales inmunes, las células transformadas pueden administrarse en el intervalo de  $10^4$  a  $10^9$  células, más específicamente de  $10^4$  a  $10^6$  células. Generalmente, se administran múltiples dosis de inmunógeno a intervalos regulares hasta que se eleva el título de anticuerpos. Por ejemplo, en el caso de una inmunización a corto plazo, las células transformadas se administran a intervalos de 2 a 4 días, más específicamente a intervalos de 3 días. Tras administrarse dos o tres veces, las células productoras de anticuerpos pueden recuperarse. Alternativamente, se administran una vez a la semana y las células productoras de anticuerpos también pueden recuperarse tras administrarse cinco o seis veces.

20 En la presente invención, las células productoras de anticuerpos recuperadas se clonan para proporcionar anticuerpos monoclonales. Es preferible que las células productoras de anticuerpos se immortalicen para la clonación. Por ejemplo, puede usarse el método de fusión celular tal como se tipifica mediante el método del hibridoma o transformación mediante virus de Epstein-Barr (VEB) como el método de immortalización de células productoras de anticuerpos.

25 En cuanto a las células productoras de anticuerpos, una célula produce una clase de anticuerpo. Por tanto, el establecimiento de poblaciones celulares derivadas de una célula (es decir, la clonación) permite producir anticuerpos monoclonales. El método del hibridoma implica el proceso en el que se fusionan células productoras de anticuerpos con una línea celular apropiada, que se immortaliza y luego se somete a clonación. Las células productoras de anticuerpos immortalizadas pueden clonarse mediante una técnica tal como el método de dilución limitante. Se sabe que existen muchas líneas celulares útiles para el método del hibridoma. Estas líneas celulares son excelentes en la eficacia de immortalización de células linfocíticas y tienen diversos marcadores genéticos que son necesarios para seleccionar las células fusionadas de manera satisfactoria. Además, cuando se pretende la producción de células productoras de anticuerpos, puede usarse una línea celular que carece de la capacidad para producir anticuerpos también.

30 Por ejemplo, se usan ampliamente los mielomas de ratón P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580) y P3x63Ag8U.1 (ATCC CRL-1597) como líneas celulares útiles para el método de fusión celular para ratones o ratas. En general, un hibridoma se produce mediante la fusión de células homogéneas, mientras que un anticuerpo monoclonal también puede obtenerse a partir del heterohibridoma de una especie diferente entre especies estrechamente relacionadas.

35 Se conocen de manera pública protocolos específicos de fusión celular. Es decir, se mezclan células productoras de anticuerpos de animales inmunes con parejas de fusión apropiadas para realizar la fusión celular. Los ejemplos que pueden usarse de la célula productora de anticuerpos incluyen células esplénicas, células linfocíticas recogidas del ganglio linfático y células B de sangre periférica. Como parejas de fusión, pueden usarse diversas líneas celulares descritas previamente. Pueden usarse el método del polietilenglicol y el método de fusión eléctrica para la fusión celular.

40 A continuación, basándose en marcadores selectivos de células fusionadas, se seleccionan las células fusionadas de manera satisfactoria. Por ejemplo, cuando se usa la línea celular sensible a HAT para la fusión celular, las células fusionadas de manera satisfactoria se seleccionan mediante la selección de células que crecen en medio HAT. Además, se confirma que los anticuerpos producidos por las células seleccionadas tienen la capacidad de respuesta deseada.

45 Se examina cada hibridoma basándose en la capacidad de respuesta de anticuerpos. Es decir, se selecciona el hibridoma que produce anticuerpos que se unen a ILT7 humano mediante el método tal como se describió previamente. Preferiblemente, cuando el hibridoma seleccionado se subclona y entonces se confirma finalmente la producción del anticuerpo deseado, se selecciona el anticuerpo confirmado como hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención:

50 Específicamente, el hibridoma deseado puede seleccionarse basándose en la capacidad de respuesta frente a células humanas o la capacidad de respuesta frente a la célula transformada que expresa el gen de ILT7 humano. Los anticuerpos, que se unen a células, pueden detectarse basándose en el principio de inmunoensayo. Por ejemplo, ELISA, que usa células como antígenos, puede utilizarse para la detección del anticuerpo deseado. Específicamente, se pone en contacto un sobrenadante de cultivo del hibridoma con un soporte sobre el que se usa

la IPC humana o la célula transformada como inmunógeno. En el caso en el que el sobrenadante de cultivo comprende el anticuerpo deseado, el anticuerpo se atrapa en la célula inmovilizada sobre el soporte. Entonces, se separa la fase sólida del sobrenadante de cultivo, que se lava, si es necesario. Después de eso, puede detectarse el anticuerpo atrapado en la fase sólida. Un anticuerpo, que reconoce un anticuerpo, puede usarse para la detección de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón puede detectarse mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón. La detección es fácil si se marca el anticuerpo, que reconoce un anticuerpo. Los ejemplos que pueden usarse del marcador incluyen enzimas, colorantes fluorescentes, colorantes luminiscentes, y similares.

Por otro lado, pueden usarse partículas y una pared interna de una placa de microtitulación como el soporte sobre el que se inmovilizan las células. Las células pueden inmovilizarse sobre partículas compuestas por plástico o la superficie de un recipiente mediante adsorción física. Los ejemplos que pueden usarse del soporte para inmovilizar células incluyen perlas compuestas por poliestireno y recipientes de reacción.

En la selección de los hibridomas, puede predecirse la producción del anticuerpo que no es contra ILT7 sino la célula huésped de la célula transformada usada como inmunógeno. Por ejemplo, tal como se ilustra en los ejemplos, en el caso en el que se usa una célula humana como inmunógeno y se usa un ratón como animal inmune, la célula humana se reconoce como sustancia foránea. Por tanto, se predice la producción de un anticuerpo, que se une a la sustancia foránea. En la presente invención, se pretende obtener un anticuerpo que pueda reconocer ILT7 humano. Por tanto, no es necesario obtener un anticuerpo que reconozca antígenos de células humanas distintos de ILT7 humano. Para eliminar los hibridomas, que producen un anticuerpo de este tipo en el examen, los anticuerpos no deseados pueden adsorberse antes de la confirmación de la capacidad de respuesta del anticuerpo.

Los anticuerpos no deseados pueden adsorberse por un antígeno al que se une un anticuerpo que se supone que existe. Específicamente, por ejemplo, un anticuerpo contra antígenos de células humanas distintos de ILT7 humano puede adsorberse por una célula que no puede detectar la expresión de ILT7 humano. En la presente invención, es preferible usar la célula huésped usada para el inmunógeno como antígeno para absorber los anticuerpos no deseados. Alternativamente, una célula huésped que no expresa el dominio extracelular de ILT7 humano, pero que expresa una molécula que se asocia con ILT7 puede usarse como el antígeno para absorber los anticuerpos.

En cuanto al anticuerpo monoclonal cuya actividad de unión a antígeno se confirma, su efecto real sobre la actividad de IPC se confirma, si es necesario. El efecto sobre IPC puede confirmarse mediante métodos tales como los métodos descritos a continuación.

En cuanto al anticuerpo monoclonal de la presente invención, se cultiva un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal y se recupera el anticuerpo monoclonal de la presente invención del cultivo resultante. El hibridoma puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En el caso *in vitro*, el hibridoma puede cultivarse usando un medio de cultivo conocido tal como RPMI1640. La inmunoglobulina secretada por el hibridoma se acumula en el sobrenadante de cultivo. Por tanto, el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede obtenerse recogiendo el sobrenadante de cultivo y purificándolo, si es necesario. Es más fácil purificar la inmunoglobulina cuando no se añade suero al medio de cultivo. Sin embargo, con el fin de una proliferación más rápida del hibridoma y la facilitación de la producción de anticuerpos, también puede añadirse suero bovino fetal al 10% al medio de cultivo.

El hibridoma también puede cultivarse *in vivo*. Específicamente, puede realizarse el cultivo intraperitoneal del hibridoma mediante la inoculación del hibridoma en la cavidad abdominal de ratones desnudos. Se acumulan anticuerpos monoclonales en la ascitis. Por tanto, si se obtiene la ascitis y se purifica según sea necesario, puede producirse el anticuerpo monoclonal requerido. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden modificarse o procesarse apropiadamente según el uso pretendido.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede expresarse mediante la obtención de ADNc que codifica para la región de unión a antígeno del anticuerpo procedente del hibridoma y la inserción en un vector de expresión apropiado. Se conoce la técnica en la que se obtiene ADNc que codifica para una región variable de anticuerpo y entonces se expresa en una célula huésped apropiada. Además, también se conoce el método en el que se prepara un anticuerpo quimérico mediante ligamiento de una región variable que comprende la región de unión a antígeno en una región constante.

Los ejemplos preferibles del anticuerpo monoclonal en la presente invención comprenden anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma #11 (número de registro: FERM BP-10704), el hibridoma #17 (número de registro: FERM BP-10705) o el hibridoma #37. Se describen a continuación secuencias de aminoácidos que constituyen regiones variables de estos anticuerpos monoclonales así como secuencias de bases de ADNc que codifican para las mismas. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos que van a obtenerse mediante conjugación de estas regiones variables con regiones constantes de otras inmunoglobulinas son preferibles en la presente invención. En secuencias de aminoácidos descritas en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos desde 1 hasta el extremo C-terminal constituye una proteína madura. Es decir, la secuencia de aminoácidos consecutiva desde 1 hasta el extremo C-terminal para cada secuencia de aminoácidos es una secuencia madura de cada secuencia de aminoácidos. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos representada por un valor numérico desde el extremo N-terminal hasta -1 es una secuencia señal.

	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
#11	SEQ ID NO: 38 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 40 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 39 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 41 (secuencia de aminoácidos)
#17	SEQ ID NO: 42 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 44 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 43 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 45 (secuencia de aminoácidos)
#37	SEQ ID NO: 46 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 48 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 47 secuencia señal	SEQ ID NO: 49 (secuencia de aminoácidos)

5 Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo quimérico de ratón (región variable)-ser humano (región constante) mediante ligamiento de estos genes de región variable en una región constante de cadena pesada de IgG1 humana y un gen que codifica para la región constante de cadena ligera de IgG1 humana, respectivamente. A continuación se describen respectivamente secuencias de aminoácidos de un anticuerpo quimérico de este tipo y secuencias de bases que codifican para las mismas. Los anticuerpos quiméricos especificados por estas secuencias muestran la construcción de una realización preferida del anticuerpo monoclonal anti-ILT7 en la presente invención. En las siguientes secuencias de aminoácidos de anticuerpos quiméricos, la secuencia de aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta -1 corresponde a la secuencia señal y la secuencia de aminoácidos desde 1 hasta el extremo C-terminal corresponde a la proteína madura. Es decir, un anticuerpo quimérico compuesto por cadenas pesada y ligera, que consisten en la secuencia de aminoácidos desde 1 hasta el extremo C-terminal para cada secuencia de aminoácidos, es preferible en la presente invención.

	Cadena pesada	Cadena ligera
#11	SEQ ID NO: 50 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 52 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 51 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 53 (secuencia de aminoácidos)
#17	SEQ ID NO: 51 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 56 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 55 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 57 (secuencia de aminoácidos)

15 Además, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal también puede injertarse a otras inmunoglobulinas. La región variable de inmunoglobulina se compone de una región determinante de complementariedad (CDR) y una región de entramado. La propiedad de unión a antígeno de cada inmunoglobulina se determina mediante CDR y la región de entramado mantiene la estructura de región de unión a antígeno. La secuencia de aminoácidos de CDR es de una diversidad extremadamente grande, mientras que la secuencia de aminoácidos de la parte de la región de entramado está altamente conservada. Se sabe que la secuencia de aminoácidos que constituye la CDR se incorpora en la región de entramado de otras moléculas de inmunoglobulina, lo que permite el injerto de la actividad de unión a antígeno. Se ha establecido el método en el que la propiedad de unión a antígeno de diferentes inmunoglobulinas se injerta a inmunoglobulina humana usando este proceso. Tal como se usa en el presente documento, el término "región de unión a antígeno" puede comprender la CDR que se injerta a la región de entramado. Por tanto, el término "fragmento que comprende la región de unión a antígeno" de un determinado anticuerpo monoclonal" comprende un fragmento de inmunoglobulina humana que comprende la región variable en la que se injerta la CDR del anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, cada una de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables mencionadas anteriormente comprende las siguientes secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO) como CDR.

	CDR1.	CDR2	CDR3
cadena pesada de #11	SDYAWN (58)	YISYSGSTSYNPSLKS (59)	SPPYYAMDY (60)
cadena ligera de #11	KASQDVGTA (61)	WASTRHT (62)	QQYSSYPLT (63)
cadena pesada de #17	SYWIH (64)	RIYPGTGSTYYNEKFKG (65)	YPTYDWYFDV (66)
cadena ligera de #17	RASQISNILH (67)	YASQIS (68)	QQNSWPLT (69)
cadena pesada de #37	SDYAWN (70)	YISYSGSTSYNPSLKS (71)	ALPLPWFAY (72)
cadena ligera de #37	KASQDVGTA (73)	WASTRHT (74)	QQYSSYPYT (75)

35 Basándose en la información de la secuencia de bases que codifica para las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente y la información de la secuencia de bases que codifica para la región de entramado (FR) de inmunoglobulina humana, puede diseñarse un cebador y puede amplificarse un ADNc que tiene una secuencia de bases obtenida mediante conjugación de ambas secuencias de bases. Se repite la operación para cada región de entramado y puede construirse una región variable en la que CDR1, CDR2 y CDR3 de ratones se conectan mediante FR humana. Además, cuando la secuencia de bases, que codifica para una región constante de inmunoglobulina humana, se conjuga según sea necesario, puede obtenerse un anticuerpo humanizado con la región constante.

45 Como el anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables mencionadas anteriormente o un anticuerpo humanizado en el que se injerta una CDR que constituye una región variable, un anticuerpo con una región constante derivada de IgG o IgM está comprendido en un anticuerpo preferible en la presente invención. Los presentes inventores confirmaron que el anticuerpo monoclonal contra ILT7 mostró acción de CDC sobre células que expresan ILT7. Por tanto, el anticuerpo que tiene una región constante derivada de IgG o IgM presenta citotoxicidad contra células que expresan ILT7 debido al efecto de CDC. Tales anticuerpos son útiles en la inhibición

del número de células que expresan ILT7 tales como las IPC.

El anticuerpo quimérico que puede reconocer ILT7 o anticuerpo humanizado, que se proporciona por la presente invención, puede producirse mediante ingeniería genética usando polinucleótidos que codifican para estos anticuerpos. Por ejemplo, un polinucleótido que es la secuencia de bases descrita en las siguientes SEQ ID NO y codifica para la secuencia de aminoácidos que constituye una proteína madura para cada secuencia de aminoácidos, puede usarse como polinucleótido que codifica para la región variable de #11 o #17. La secuencia de aminoácidos consecutiva desde 1 hasta el extremo C-terminal para cada secuencia de aminoácidos corresponde a una proteína madura. En el caso en el que cada proteína madura se expresa como una proteína independiente, es preferible colocar la señal de secreción en el extremo N-terminal de cada secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en las secuencias de aminoácidos mostradas en estas SEQ ID NO, la secuencia de aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta -1 puede usarse como secuencia señal cuando tales proteínas se expresan en células animales. Alternativamente, estas regiones variables pueden secretarse como proteínas maduras usando una secuencia señal arbitraria que permite la secreción de inmunoglobulina.

#11	SEQ ID NO: 50 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 52 (secuencia de bases)
#17	SEQ ID NO: 54 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 56 (secuencia de bases)

De la misma manera tal como se describió anteriormente, en cuanto al polinucleótido que codifica para el anticuerpo humanizado, puede prepararse un polinucleótido que expresa el anticuerpo humanizado usando la secuencia de bases que codifica para una proteína que tiene la secuencia señal que va a añadirse al extremo N-terminal. Cuando se portan las cadenas pesada y ligera en vectores independientes, ambos vectores se cotransfectan en la misma célula huésped. Las cadenas pesada y ligera expresadas desde cada vector se usan para construir una molécula de inmunoglobulina con ambas cadenas. O bien, también puede portarse un polinucleótido que codifica para una cadena pesada y un polinucleótido que codifica para una cadena ligera en el mismo vector. La célula huésped en la que se cotransfecta un vector que porta ambos polinucleótidos expresa las cadenas pesada y ligera y produce una inmunoglobulina que tiene ambas cadenas.

Estos polinucleótidos pueden expresarse como anticuerpos usando un sistema huésped-vector que puede expresar un gen de anticuerpo. Además, en el caso en el que se expresan como una única molécula de proteína mediante la conexión de una región variable de cadena pesada con una región variable de cadena ligera, puede colocarse una secuencia señal en el extremo N-terminal de la molécula de proteína. Un ejemplo conocido de una molécula de anticuerpo de este tipo incluye molécula de scFv en la que una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera se conectan mediante un ligador.

Cada uno de los anticuerpos monoclonales así producidos está comprendido en el anticuerpo monoclonal de la presente invención. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal que consiste en una inmunoglobulina que comprende la región de unión a antígeno codificada por un polinucleótido derivado de ADNc que codifica para la región de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente está comprendido en el anticuerpo monoclonal en la presente invención.

Tal como se describió previamente, podrían usarse células RBL en las que se forzó que se expresase el gen de ILT1 como inmunógeno para obtener anticuerpos frente a ILT1. Sin embargo, la expresión de ILT7 en la superficie de células RBL (P815) no pudo confirmarse y por tanto no pudo usarse como el inmunógeno. Los presentes inventores descubrieron que la expresión de ILT7 humano en la superficie celular podía inducirse mediante la coexpresión de ILT7 humano y otras proteínas de membrana celular que se asocian con ILT7 humano. Entonces, los presentes inventores encontraron que el anticuerpo, que se une a IPC humanas, puede obtenerse usando la célula transformada cuya expresión se induce así como inmunógeno y completarse la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona el inmunógeno para producir el anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 humano, y comprende células animales en las que se mantienen (a) un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano; y (b) un polinucleótido que codifica para la cadena del receptor de Fc de modo que se expresen de manera exógena o fracciones de membrana celular de los mismos.

Han pasado ya seis años o más desde que la estructura de ILT7 humano se halló en 1998. Sin embargo, el anticuerpo que puede reconocer específicamente ILT7 no se ha obtenido todavía. Se proporcionó por primera vez el anticuerpo que puede reconocer ILT7 humano usando el inmunógeno de la presente invención. Es decir, la presente invención proporcionó el anticuerpo que puede reconocer ILT7 humano que puede obtenerse mediante las siguientes etapas de:

- (1) administrar una célula que expresa de manera exógena una proteína que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano y una molécula que está asociada con ILT7 humano a animales inmunes;
- (2) seleccionar una célula productora de anticuerpos que produce el anticuerpo que se une a ILT7 humano de células productoras de anticuerpos de los animales inmunes; y

(3) cultivar las células productoras de anticuerpos seleccionadas mediante la etapa (2) y recuperar un anticuerpo que puede reconocer ILT7 humano de los cultivos.

5 Se encuentra que ILT7 humano se expresa específicamente en IPC humanas. En el análisis de la expresión génica mediante SAGE que se realizó por los presentes inventores, también se confirmó la expresión específica de ILT7 humano en IPC humanas. Sin embargo, en los anteriores informes, se analizaron los niveles de expresión de ILT7 de ambos casos basándose en ARNm. Puesto que no se proporcionó el anticuerpo que puede detectar ILT7 humano, no se analizó el estado de expresión de la proteína de manera convencional. El análisis de la proteína de  
10 ILT7 humano se realizó mediante la provisión del anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 humano en la presente invención.

Los presentes inventores confirmaron realmente que el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano basándose en la presente invención detectaba específicamente IPC humanas. Es decir, la presente  
15 invención se refiere a un método para detectar células productoras de interferón, que comprende las etapas de: poner en contacto un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano o un fragmento que comprende la región de unión a antígeno con una célula de prueba; y detectar el anticuerpo monoclonal que se une a células o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno.

20 La detección de ILT7 humano basándose en la presente invención permite determinar si una determinada célula es IPC. Es decir, la presente invención proporciona un método para identificar las IPC usando ILT7 humano como indicador. O bien, pueden separarse IPC humanas separando las células en las que se detectó ILT7 humano basándose en la presente invención. Es decir, la presente invención proporciona un método para separar las IPC usando ILT7 humano como indicador.

25 Basándose en el análisis mediante anticuerpo frente a ILT7 humano, se confirmó que se reducía el nivel de expresión de ILT7 en las IPC cuya diferenciación se indujo mediante CpG, y similares. Es decir, las IPC antes de que se induzca su diferenciación pueden detectarse específicamente usando ILT7 como indicador. En otras palabras, el anticuerpo monoclonal de la presente invención es útil, particularmente en la detección de las IPC antes de su diferenciación en células dendríticas. Tal como se usa en el presente documento, el término "IPC antes de su diferenciación" puede definirse como poblaciones celulares que mantienen la capacidad para producir interferón.

30 En la presente invención, el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano o el fragmento que comprende su región de unión a antígeno puede marcarse por adelantado. Por ejemplo, pueden detectarse fácilmente anticuerpos mediante marcaje con colorantes luminiscentes o colorantes fluorescentes. Más específicamente, el anticuerpo marcado con colorante fluorescente se pone en contacto con una población celular que puede comprender las IPC y entonces pueden detectarse células a las que se unió el anticuerpo de la presente invención usando el colorante fluorescente como indicador. Además, las IPC pueden separarse separando las células en las que el colorante fluorescente se detecta. Puede realizarse fácilmente una serie de las etapas basándose en el principio de FACS. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención puede unirse por adelantado a un soporte de fase sólida tal como partículas magnéticas. El anticuerpo unido al soporte en fase sólida reconoce ILT7 humano y entonces las IPC se atrapan en el soporte en fase sólida. Como resultado, las IPC pueden detectarse o separarse.

45 El anticuerpo necesario para el método para detectar las IPC basándose en la presente invención puede proporcionarse como reactivo para detectar las IPC. Es decir, la presente invención proporciona un reactivo para detectar células productoras de interferón, que comprende el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano o el fragmento que comprende su región de unión a antígeno. El reactivo para detectar las IPC de la presente invención puede usarse en combinación con un control positivo o un control negativo además de anticuerpos. Por ejemplo, las células transformadas que expresan el dominio extracelular de ILT7 humano y se usan para el inmunógeno así como las IPC obtenidas de ser humano pueden usarse como los controles positivos. Habitualmente, sólo pueden obtenerse unas pocas IPC humanas a partir de la sangre periférica. Por tanto, es preferible usar, particularmente una célula transformada como el control positivo en el reactivo de la presente invención. Por otro lado, una célula arbitraria, que no expresa ILT7 humano, puede usarse como el control negativo.

55 Es decir, la presente invención proporciona un kit para detectar IPC humanas que comprende:

60 (a) el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano o el fragmento que comprende su región de unión a antígeno; y

(b) la célula que expresa una proteína exógena que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano y una molécula exógena que está asociada con ILT7 humano.

65 Los presentes inventores analizaron el efecto del anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 humano sobre las IPC. Como resultado, se confirma que el anticuerpo, que se une al dominio extracelular de ILT7 humano, inhibe la actividad de las IPC. Es decir, la presente invención se refiere a un método para inhibir la actividad de

células productoras de interferón, que comprende una etapa de poner en contacto cualquiera de los siguientes componentes con células productoras de interferón:

5 (a) un anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano e inhibe la actividad de células productoras de interferón o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno; y

(b) una inmunoglobulina en la que se injerta una región determinante de complementariedad del anticuerpo monoclonal descrito en (a) o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno.

10 O bien, la presente invención se refiere a un método para inhibir la actividad de células productoras de interferón en organismos vivos, que comprende una etapa de administrar cualquiera de los siguientes componentes a los organismos vivos:

15 (a) el anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano e inhibe la actividad de células productoras de interferón o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno;

(b) un fragmento que comprende la inmunoglobulina en la que se injerta una región determinante de complementariedad del anticuerpo monoclonal descrito en (a) o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno; y

20 (c) un polinucleótido que codifica para los componentes descritos en (a) o (b).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "células productoras de interferón (IPC)" significa células que tienen la capacidad para producir IFN y expresar ILT7 en la superficie celular. A continuación en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, el término "IPC" engloba no sólo células que son células precursoras de células dendríticas sino también las células que tienen la capacidad para producir IFN y expresar ILT7 en la superficie celular. Se conocen comúnmente métodos para identificar tales IPC. Las IPC pueden distinguirse de otras células sanguíneas usando algunos marcadores de superficie celular como indicadores. Específicamente, se describe a continuación un perfil de marcadores de superficie celular de IPC humanas (Shortman, K. y Liu, YJ. *Nature Reviews* 2: 151-161, 2002). En los últimos años, un determinado informe también ha sugerido que célula positiva para BDCA-2 se define como IPC (Dzionek, A. *et al.* *J. Immunol.* 165: 6037-6046, 2000.). [Profile of cell surface antigens of human IPCs] positiva para CD4, positiva para CD123, negativa para linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) y negativa para CD11c.

35 Por tanto, también puede decirse que las IPC son células que tienen el perfil de expresión de estos marcadores conocidos y tienen la capacidad para producir IFN. Además, están comprendidas en las IPC células en organismos vivos con la capacidad para producir IFN, aunque las células sean una población celular con perfiles diferentes del patrón de expresión del perfil de expresión de estos marcadores.

40 Además, ejemplos de las características, que se observan comúnmente en IPC humanas, son tal como sigue:

[Característica morfológica de las células]

- 45 - Similares a células plasmáticas
- Células redondas con una superficie celular lisa
- El núcleo es relativamente grande

50 [Característica funcional de las células]

- Durante la infección viral, se produce una gran cantidad de interferones tipo 1 en un corto periodo de tiempo.
- 55 - Se diferencian en células dendríticas tras la infección viral.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibición de la actividad de IPC" significa la inhibición de al menos una de las funciones de las IPC. Los ejemplos de la función de las IPC incluyen la producción de IFN y la supervivencia celular. La supervivencia celular también puede traducirse en el número de células. Por tanto, en el caso de inhibir ambas o cualquiera de estas funciones, se dice que se inhibe la actividad de las IPC. Se encuentra que el IFN tipo 1 producido por las IPC conduce a diversas enfermedades. Por tanto, la inhibición del número de las IPC y la producción de IFN es útil para una estrategia de tratamiento médico de esas enfermedades.

65 Por ejemplo, se ha señalado la relación entre el estado patológico de enfermedades autoinmunitarias e IFN $\alpha$ . La mayor parte del IFN $\alpha$  se produce por las IPC. Por tanto, pueden aliviarse estados patológicos provocados por IFN $\alpha$  mediante la inhibición de la producción de IFN $\alpha$ . Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibición de la producción de IFN por IPC" significa la inhibición de la producción de al menos uno de los IFN producidos por

las IPC. Preferiblemente, IFN en la presente invención es el IFN tipo 1. Entre ellos, IFN $\alpha$  es importante.

Es decir, la presente invención se refiere a un inhibidor de la producción de IFN que comprende un anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 como componente activo. O bien, la presente invención proporciona un método para inhibir la producción de IFN que comprende una etapa de administrar el anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7. Además, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 en la producción de una composición medicinal para inhibir la producción de IFN.

Las células en las que se produce una gran cantidad de IFN por un pequeño número de células están incluidas en las IPC. Por ejemplo, células precursoras de células dendríticas estimuladas por virus y similares producen la mayor parte del IFN producido por el organismo vivo. La inhibición del número de las IPC que producen gran cantidad de IFN da como resultado la supresión de la producción de IFN. Por tanto, pueden reducirse estados patológicos provocados por IFN $\alpha$  mediante la inhibición del número de las IPC. Se confirmó que anticuerpo monoclonal anti-ILT7 se unía a células que expresan ILT7 y entonces se proporcionaba el efecto de citotoxicidad mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en una realización preferible de la presente invención. El efecto de CDC es uno de los mecanismos importantes del fármaco anticuerpo. El anticuerpo monoclonal anti-ILT7 de la presente invención también tiene potente citotoxicidad contra células que expresan ILT7 tales como las IPC debido al efecto de CDC de las mismas. Es decir, en cuanto al anticuerpo monoclonal anti-ILT7, puede esperarse el efecto de inhibición de la producción de IFN mediante citotoxicidad contra las IPC, además del mecanismo de inhibición de la producción de IFN en una realización preferible.

El anticuerpo, que reconoce el dominio extracelular de ILT7 humano que va a usarse para la presente invención, puede obtenerse basándose en el método descrito previamente. El anticuerpo en la presente invención puede ser de cualquier clase. Las especies de organismo de las que se deriva el anticuerpo no están limitadas tampoco. Además, puede usarse como anticuerpo un fragmento que comprende la región de unión a antígeno del anticuerpo. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión a antígeno que se obtiene mediante digestión enzimática de IgG puede usarse como el anticuerpo en la presente invención. Específicamente, fragmentos de anticuerpo tales como Fab y F(ab')<sub>2</sub> pueden obtenerse mediante digestión con papaína o pepsina. Se sabe bien que estos fragmentos de anticuerpo pueden usarse como moléculas de anticuerpo que tienen afinidad por anticuerpos. Alternativamente, también pueden usarse anticuerpos contruidos mediante recombinación genética siempre que se mantenga una actividad de unión a antígeno satisfactoria. Los ejemplos de los anticuerpos contruidos mediante recombinación genética incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos trasplantados con CDR, Fv de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos poliespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. Es de conocimiento común que estos anticuerpos pueden proporcionarse usando anticuerpos monoclonales.

En la presente invención, pueden modificarse anticuerpos, si es necesario. Según la presente invención, el anticuerpo, que reconoce el dominio extracelular de ILT7 humano, tiene un efecto inhibidor sobre la actividad de las IPC. Es decir, se contempla que el propio anticuerpo tenga citotoxicidad contra las IPC. Se conocen subclases de anticuerpos que presentan una potente actividad efectora. Alternativamente, el efecto inhibidor sobre la actividad de IPC puede potenciarse además modificando anticuerpos con un agente citotóxico. A continuación se describen ejemplos del agente citotóxico.

Toxinas: entotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina diftérica, ricina

Radioisótopos: Tc<sup>99m</sup>, Sr<sup>89</sup>, I<sup>131</sup>, Y<sup>90</sup>

Agentes anticancerígenos: calicheamicina, mitomicina, paclitaxel

Pueden conjugarse toxinas que consisten en proteínas con anticuerpos o sus fragmentos con un reactivo bifuncional. Alternativamente, un gen que codifica para una toxina se conecta a un gen que codifica para un anticuerpo y también pueden obtenerse proteínas de fusión de ambos genes. También se conoce el método para conjugar anticuerpos con radioisótopos. Por ejemplo, se conoce el método para marcar anticuerpos con radioisótopos usando un agente quelante. Además, los agentes anticancerígenos pueden conjugarse con anticuerpos usando cadenas de azúcar o el reactivo bifuncional.

Los presentes inventores han confirmado un fenómeno en el que un anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 expresado en una membrana celular se incorpora en células tras su unión (internalización). Por tanto, los agentes citotóxicos pueden suministrarse a células mediante la puesta en contacto de anticuerpos conjugados con estos agentes citotóxicos de la presente invención con células que expresan ILT7. Es decir, la presente invención proporciona un inhibidor activo de células que expresan ILT7 que comprende el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 con el que se conjuga el agente citotóxico como componente activo. O bien, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal anti-ILT7 con el que se conjuga el agente citotóxico en la producción del inhibidor activo de células que expresan ILT7. Además, la presente invención proporciona un método para inhibir la actividad de células que expresan ILT7 que comprende una etapa de administrar el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 con el que se conjuga el agente citotóxico.

En la presente invención, un anticuerpo cuya estructura se modifica de manera artificial también puede usarse como componente activo. Por ejemplo, se conocen diversos métodos de modificación para mejorar la citotoxicidad y estabilidad de anticuerpos. Específicamente, se conoce una inmunoglobulina en la que se modifican cadenas de azúcar de cadenas pesadas (Shinkawa, T. *et al.* J. Biol. Chem. 278:3466-3473. 2003.). Se potenció la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de la inmunoglobulina mediante la modificación de cadenas de azúcar. O bien, también se conoce una inmunoglobulina en la que se modifica la secuencia de aminoácidos de la región Fc. Es decir, se potenció la actividad de ADCC aumentando de manera artificial la actividad de unión de inmunoglobulina al receptor de Fc (Shield, RL. *et al.* J. Biol. Chem. 276; 6591-6604, 2001.).

IgG, que se une al receptor de Fc, se incorpora en células una vez. Entonces, IgG se une al receptor de Fc que se expresa en endosoma y se libera en la sangre de nuevo. Este fenómeno se ha revelado. IgG con una alta actividad de unión con el receptor de Fc tiene una mayor probabilidad de liberarse en la sangre de nuevo tras su incorporación en las células. Como resultado, se amplía el tiempo de retención de IgG en sangre (Hinton, PR. *et al.* J Biol Chem. 279: 6213-6216. 2004). Además de esto, se dice que la modificación de la secuencia de aminoácidos de la región Fc provoca un cambio de la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estos anticuerpos modificados pueden usarse como el anticuerpo en la presente invención.

Cuando el anticuerpo, que se une al dominio extracelular de ILT7 humano, se pone en contacto con las IPC, se inhibe la actividad de las IPC. Por tanto, estos anticuerpos pueden usarse para un inhibidor o método para inhibir la actividad de las IPC. Es decir, la presente invención proporciona un inhibidor activo de las IPC que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en los siguientes puntos (a) a (c) como componente activo. O bien, la presente invención se refiere a un método para inhibir la actividad de las IPC que comprende una etapa de administrar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en los siguientes puntos (a) a (c). Además, la presente invención se refiere al uso de al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en los siguientes puntos (a) a (c) en la producción del inhibidor activo de las IPC:

(a) el anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno;

(b) la inmunoglobulina en la que se injerta una región determinante de complementariedad del anticuerpo descrito en (a) o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno; y

(c) un polinucleótido que codifica para componentes descritos en (a) o (b). En la presente invención, el anticuerpo monoclonal, que reconoce el dominio extracelular de ILT7 humano, puede usarse como el anticuerpo monoclonal, que inhibe la actividad de las IPC. En la presente invención, pueden usarse uno o más anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, uno o más anticuerpos monoclonales, que reconocen el dominio extracelular de ILT7 humano, se combinan para usarse en la presente invención.

Puede confirmarse que los anticuerpos tienen un efecto inhibidor sobre la producción de IFN por IPC de la manera tal como se describe a continuación. Las IPC producen una gran cantidad de IFN debido a estimulación viral. Se administran anticuerpos a las IPC antes de, después de, o al mismo tiempo que la estimulación de las IPC con virus. La capacidad para producir cada IFN para las IPC resultantes se compara con la de cada control al que no se administran anticuerpos. La capacidad para producir IFN puede evaluarse midiendo el IFN $\alpha$  o IFN $\beta$  contenido en el sobrenadante de cultivo de las IPC. Como resultado de la comparación, puede confirmarse que los anticuerpos sometidos a prueba son eficaces en la inhibición de la capacidad para producir IFN cuando la cantidad de IFN en el sobrenadante se disminuye significativamente mediante la adición de anticuerpos. Se conocen estos métodos para medir IFN. Las IPC producen la mayor parte del IFN en el organismo vivo. Por tanto, puede regularse un estado que produce IFN en el organismo vivo mediante la inhibición de la capacidad para producir IFN de las IPC.

En la presente invención, la actividad de las IPC engloba el mantenimiento del número de IPC. Por tanto, la inhibición de la actividad de las IPC en la presente invención comprende la inhibición del número de IPC. Cuando se confirma que el número de IPC se inhibe con la presencia de anticuerpos, puede encontrarse que los anticuerpos están inhibiendo la actividad de las IPC. Como con la producción de IFN, una inmunoglobulina inerte derivada de la misma especie animal que el anticuerpo cuya actividad debe confirmarse, puede usarse como control comparativo. El número de IPC puede compararse cuantitativamente mediante recuento de las células. El número de células puede contarse con FACS o un microscopio.

Además, se dice que las IPC se diferencian en células que inducen Th2 denominadas células dendríticas 2 (DC2) como resultado de la infección con virus o similar. Si puede inhibirse la producción de IFN de las IPC mediante estimulación viral, también puede inhibirse su diferenciación en Th2. Por tanto, puede esperarse que el anticuerpo monoclonal de la presente invención, que inhibe la producción de IFN, también pueda tener un efecto terapéutico sobre diversas enfermedades alérgicas. Cuando el anticuerpo, que reconoce el dominio extracelular de ILT7 humano, se administra a un huésped diferente de la especie de organismo de la que se deriva el anticuerpo, es deseable procesar el anticuerpo en una forma que sea difícil de reconocer como sustancia foránea por el huésped.

Por ejemplo, la inmunoglobulina no puede reconocerse fácilmente como sustancia foránea mediante el procesamiento del anticuerpo en las siguientes moléculas. Se conoce la técnica para procesar moléculas de inmunoglobulina tal como se describe a continuación. Fragmento que comprende la región de unión a antígeno que carece de una región constante (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, Academic Press Limited, 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)

Anticuerpo quimérico que se compone de la región de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal y la región constante de inmunoglobulina del huésped ("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)

Anticuerpo sustituido con CDR en el que la región determinante de complementariedad (CDR) de la inmunoglobulina del huésped se sustituye por CDR de anticuerpo monoclonal ("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Tamie Ando, eds., Kodansha, 1994)

Alternativamente, puede obtenerse un anticuerpo humano usando animales no humanos en los que se incorpora un gen de anticuerpo humano como animales inmunes, mientras que se usan los animales no humanos. Por ejemplo, se han puesto en uso práctico ratones transgénicos con genes de anticuerpos humanos para producir anticuerpos humanos como animales inmunes (Ishida *et al.*, Cloning and Stem Cells, 4: 85-95, 2002). El uso de tales animales permite obtener el anticuerpo humano que reconoce ILT7 usando inmunógenos tal como se describió previamente. Es preferible administrar anticuerpo humano a seres humanos.

Alternativamente, también puede obtenerse un gen de región variable de inmunoglobulina humana mediante un método de presentación en fago (McCafferty J. *et al.*, Nature 348:552-554, 1990; Kretzschmar T *et al.*, Curr Opin Biotechnol., diciembre de 2002; 13(6): 598-602.). En el método de presentación en fago, un gen que codifica para región variable de inmunoglobulina humana se incorpora en un gen de fago. También puede producirse una biblioteca de fagos usando diversos genes de inmunoglobulina como fuentes. Un fago expresa una región variable como proteína de fusión de la proteína compuesta por el fago. La región variable expresada por el fago en la superficie del fago mantiene la actividad de unión con un antígeno. Por tanto, se seleccionan de la biblioteca de fagos, fagos que se unen a antígenos o células en las que se expresan antígenos, permitiendo de ese modo examinar un fago en el que se expresa una región variable que tiene la actividad de unión deseada. Además, un gen que codifica para una región variable, que tiene la actividad de unión deseada, se conserva en las partículas de fago así seleccionadas. Es decir, en el método de presentación en fago, puede obtenerse un gen que codifica para una región variable con la actividad de unión deseada usando la actividad de unión de la región variable como indicador.

En el inhibidor activo de las IPC o el método para inhibir la actividad de las IPC en la presente invención, el anticuerpo que reconoce el dominio extracelular de ILT7 humano o el fragmento de anticuerpo que comprende al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo pueden administrarse como proteína o polinucleótido que codifica para la proteína. En la administración de polinucleótidos, es deseable usar un vector en el que un polinucleótido que codifica para la proteína deseada se pone bajo el control de un promotor apropiado de modo que se exprese la proteína deseada. También puede colocarse en el vector un potenciador y un terminador. Se conoce un vector que porta un gen de las cadenas pesada y ligera que constituye una inmunoglobulina y que puede expresar una molécula de inmunoglobulina.

El vector que puede expresar la inmunoglobulina puede administrarse mediante su introducción en células. En la administración a organismos vivos, puede administrarse directamente un vector, que puede infectarse con células mediante la administración a los organismos vivos. Una vez que se separan los linfocitos de los organismos vivos, entonces se introduce el vector en los linfocitos, que pueden devolverse a los organismos vivos de nuevo (*ex vivo*).

En el inhibidor activo de las IPC o el método para inhibir la actividad de las IPC basándose en la presente invención, en cuanto a la cantidad de anticuerpo monoclonal que debe administrarse a los organismos vivos, habitualmente se administra inmunoglobulina en el intervalo de 0,5 mg a 100 mg, por ejemplo, de 1 mg a 50 mg, preferiblemente de 2 mg a 10 mg por kg de peso corporal. Pueden ajustarse apropiadamente los intervalos de administración del anticuerpo a organismos vivos de modo que se mantenga una concentración eficaz de inmunoglobulina en los organismos vivos durante el periodo de tratamiento. Específicamente, por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse a intervalos de 1 a 2 semanas. La vía de administración es opcional. Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente una vía de administración eficaz en tratamientos. Los ejemplos específicos de la misma incluyen administración oral o parenteral. Los anticuerpos se administran de manera sistémica o tópica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similar. Los ejemplos de una formulación apropiada para administración parenteral en la presente invención incluyen disoluciones inyectables, supositorios y pulverizaciones. Cuando el anticuerpo se administra a células, se añade inmunoglobulina al medio de cultivo habitualmente en el intervalo de 1 µg/ml, preferiblemente 10 µg/ml, más preferiblemente 50 µg/ml, todavía más preferiblemente 0,5 mg/ml. En el inhibidor activo de las IPC o método para inhibir la actividad de las IPC de la presente invención, el anticuerpo monoclonal puede administrarse a organismos vivos mediante métodos opcionales. Habitualmente, el anticuerpo monoclonal se combina con un soporte farmacéuticamente aceptable. Si es necesario, el anticuerpo monoclonal puede combinarse con agentes aditivos tales como espesantes, estabilizantes, conservantes y solubilizantes. Los ejemplos de un soporte o agente aditivo

de este tipo incluyen lactosa, ácido cítrico, ácido esteárico, estearato de magnesio, sacarosa, almidón, talco, gelatina, agar, aceite vegetal y etilenglicol. El término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora en cada gobierno o enumerado en la Farmacopea en cada país u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, en mamíferos, y más particularmente, en seres humanos. El inhibidor activo de las IPC de la presente invención también puede proporcionarse en forma de dosis únicas o múltiples de polvos liofilizados o comprimidos. Además, los polvos liofilizados o comprimidos pueden usarse en combinación con agua esterilizada para inyección, solución salina fisiológica o disolución tampón para disolver las composiciones de modo que sea de una concentración deseada antes de la administración.

Además, cuando el anticuerpo monoclonal se administra como vector, que expresa inmunoglobulina, las cadenas pesada y ligera se cotransfectan con otro plásmido y cada plásmido puede administrarse en el intervalo de 0,1 a 10 mg, por ejemplo, de 1 a 5 mg por kg de peso corporal. Para introducir los plásmidos en células *in vitro*, el contenido de los vectores para su uso es de 1 a 5  $\mu\text{g}/10^6$  células. A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### A. Análisis de la expresión de ILT7

##### A-1) Análisis usando biblioteca de SAGE

Se comparó la expresión de genes en monocitos humanos, las IPC y las IPC tratadas con VHS y se analizó mediante el método de análisis en serie de la expresión génica (*Serial Analysis of Gene Expression*) (nombre comercial; SAGE). El método de análisis es tal como sigue. Se separaron monocitos como células positivas para BDCA-4 y se separaron las IPC como células positivas para CD14 a partir de sangre periférica humana usando un clasificador celular. Además, se cultivaron las IPC durante 12 horas con la presencia de virus del herpes simple (VHS) y entonces se prepararon las IPC diferenciadas. Se obtuvieron los ARN de las respectivas células, seguido por la producción de una biblioteca de SAGE usando el kit I-SAGE (nombre comercial) (fabricado por Invitrogen). Se analizaron los datos sobre las secuencias de bases obtenidas de aproximadamente 100.000 etiquetas usando el software de análisis de SAGE (fabricado por Invitrogen). Como resultado, se encontró un gen cuyo valor de puntuación de monocito/IPC/IPC+VHS es de 0/16/0, concretamente, ILT7 (n.º de registro de Gen Bank NM\_012276) conocido como gen, que muestra expresión específica de IPC. ILT7 es una proteína de membrana con dominios similares a inmunoglobulina codificados por una secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO: 1 (figura 2(a)). Se ha notificado que el ARNm de ILT7 se expresa en las IPC (Blood 100, 3295-3303 (2002)).

##### A-2) RT-PCR

Se examinó la expresión de ILT7 en células hemocíticas con más detalle. Se aisló cada célula de manera preparativa a partir de sangre periférica humana mediante el clasificador de células. Se extrajeron los ARN de cada una de las poblaciones celulares aisladas, a partir de los que se sintetizó ADNc. Se realizó PCR cuantitativa según un método habitual usando como molde el ADNc resultante y se analizó el nivel de expresión de ARNm de ILT7. Las condiciones usadas para las secuencias de bases de cebadores y PCR son tal como sigue:

Cebador directo: 5' CTC CAA CCC CTA CCT GCT GTC 3' (SEQ ID NO: 3) Cebador inverso: 5' TTC CCA AGG CTC CAC CAC TCT 3' (SEQ ID NO: 4)

1 ciclo de PCR (a 94°C durante 3 minutos)

25 ciclos de PCR [a 94°C durante 30 segundos, a 58°C durante 30 segundos y a 72°C durante 1 minuto]

1 ciclo de PCR (a 72°C durante 6 minutos). Cuando se examinaron las IPC estimuladas por monocitos, las IPC, los VHS y células positivas para CD19 (es decir, células B), células positivas para CD3 (es decir, células T), células T estimuladas por PMA y células positivas para CD56 (es decir, linfocitos citolíticos), se encontró que ILT7 se expresaba específicamente en las IPC (figura 1 (a)).

##### A-3) RT-PCR cuantitativa

Además, se examinó la expresión en otros órganos y tejidos mediante PCR cuantitativa usando el instrumento ABI PRISM 7000 (fabricado por Applied Biosystem). Como panel de ADNc, se usaron panel de ADNc de múltiples tejidos MTC BD (nombre comercial) (Human I; n.º de cat. 636742, Human immune; n.º de cat. 636748, Human blood fractions; n.º de cat. 636750; todos ellos fabricados por Becton Dickinson) y el mismo ADNc derivado de células hemocíticas tal como se describe en el punto 2).

Las secuencias de bases usadas de cebadores son tal como sigue:

Cebador directo para ILT7: 5' CCT CAA TCC AGC ACA AAA GAA GT 3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador inverso para ILT7: 5' CGG ATG AGA TTC TCC ACT GTG TAA 3' (SEQ ID NO: 6)

Cebador directo para GAPDH: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (SEQ ID NO: 7)

Cebador inverso para GAPDH: 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (SEQ ID NO: 8)

Se realizó la PCR usando un instrumento ABI PRISM 7000 (fabricado por Applied Biosystem) y el kit de mezcla maestra de PCR SYBR green (fabricado por la misma compañía). Se usó el software Sequence Detection System (fabricado por la misma compañía) para el análisis.

Las condiciones de reacción son tal como sigue:

Etapas 1: 1 ciclo de PCR (a 50°C durante 2 minutos)

Etapas 2: 1 ciclo de PCR (a 95°C durante 10 minutos)

Etapas 3: 40 ciclos de PCR (a 95°C durante 15 segundos, a 60°C durante 1 minuto). Se comparó la expresión del gen de ILT7 entre cada tejido mediante normalización al nivel de expresión del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se sabe que se expresa de manera constitutiva. Como resultado, se observó que ILT7 no se expresaba en ningún órgano distinto de tejidos linfoides y se expresaba específicamente en las IPC.

#### B. Producción de vectores de expresión de ILT7 y FcRγ

Posteriormente, se llevó a cabo la clonación de genes y la producción de vectores de expresión para expresar proteínas ILT7.

##### B-1) Clonación de genes de ILT7

Se extrajo ARN de poli (A)<sup>+</sup> separado de sangre periférica humana de las IPC, a partir del que se sintetizó ADNc usando cebador de oligo dT y el sistema Super Script Choice para el kit de síntesis de ADNc. Se ligó un adaptador de EcoRI en el ADNc sintetizado, que se ligó en el vector pME18S escindido por EcoRI, dando como resultado la producción de una biblioteca de ADNc de IPC humanas. Se amplificó el gen de ILT7 mediante un método de PCR usando como molde la biblioteca de ADNc producida así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. Se usó 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) para la reacción PCR. Se fijaron las condiciones de reacción a 25 ciclos de PCR [a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 2 minutos] tras 1 ciclo de PCR a 94°C durante 2 minutos. Cebador directo: 5' CAG GGC CAG GAG GAG GAG ATG 3' (SEQ ID NO: 9) Cebador inverso: 5' TCA GCA GAC ACT TCC CCA ACT 3' (SEQ ID NO: 10)

Se separó el fragmento de ADNc de ILT7 de 2 kb y se recuperó mediante electroforesis usando gel de agarosa al 1%, que se clonó en el vector de plásmido pCR4 Blunt-TOPO (fabricado por Invitrogen) usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizaron las secuencias de bases de los genes obtenidos, y se encontró que se obtuvo el gen de ILT7 deseado mostrado en SEQ ID NO: 1.

##### B-2) Producción de vectores de expresión de ILT7 etiquetados con FLAG

Se construyó un plásmido que expresa una proteína en la que se fusionaron etiquetas FLAG a los extremos N- y C-terminales de ILT7, respectivamente. Se fusionó ILT7 con una etiqueta, que permitía la confirmación de la expresión de la proteína ILT7 mediante detección de la etiqueta. Se amplificó la secuencia deseada mediante un método de PCR usando como molde el gen de ILT7 producido tal como se describe en el punto 1) así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. Se usó 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) para la reacción PCR. Se fijaron las condiciones de reacción a 25 ciclos de PCR [a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 2 minutos] tras 1 ciclo de PCR a 94°C durante 2 minutos.

Para N-FLAG ILT7

Cebador directo (SEQ ID NO: 11): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC CTG CTC TTC TTT GGG CTG AGC CTG GGC [GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG] CCC AGG ACC CGG GTG CAG GCA GAA 3'

Cebador inverso (SEQ ID NO: 12): 5' C TAG act agt TCA GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

Para C-FLAG ILT7

Cebador directo (SEQ ID NO: 13): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC 3'

Cebador inverso (SEQ ID NO: 14): 5' C TAG act agt TCA [CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC] GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

- 5 En las secuencias de bases mencionadas anteriormente, cada parte destacada entre paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica para la etiqueta FLAG unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Se escindieron por XhoI y SpeI los fragmentos de ADN amplificados por PCR, que entonces se separaron mediante electroforesis en gel. Se recuperaron fragmentos de ADN de 2 kb, que se ligaron en el vector pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera que se describió anteriormente.
- 10 Entonces, se construyeron dos tipos de plásmido que pueden expresar la proteína de fusión deseada, es decir pME18XN-FLAG ILT7 y pME18X-C-FLAG ILT7, respectivamente.

### B-3) Clonación de genes de FcR $\gamma$

- 15 Se consideró la proteína FcR $\gamma$  como una proteína que puede asociarse con la proteína ILT7. La presente molécula es un gen con secuencias de bases y secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 16 (n.º de registro de Genbank NM\_004106, J. Biol. Chem. 265, 6448-6452 (1990)). La molécula es una molécula (cadena  $\gamma$ ) que constituye Fc $\epsilon$ RI, es decir un receptor de IgE de alta afinidad. Aunque también se denomina Fc $\epsilon$ Rly, se denominará FcR $\gamma$  a continuación en el presente documento. A este respecto, la presente molécula también se conoce como
- 20 componente de FcR $\gamma$  o Fc $\alpha$ R. Se clonó el presente gen mediante un método de PCR tal como se muestra a continuación para producir vectores de expresión. Se amplificó el gen de FcR $\gamma$  mediante un método de PCR usando como molde la biblioteca de ADNc de IPC humanas tal como se describe en el punto 1) así como usando cebadores con las siguientes base secuencias. Se usó 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) para la reacción PCR. Se fijaron las condiciones de reacción a 25 ciclos de PCR [a 94°C durante 15 segundos,
- 25 a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 1 minuto] tras 1 ciclo de PCR a 94°C durante 2 minutos.

Cebador directo: 5' CCC AAG ATG ATT CCA GCA GTG 3' (SEQ ID NO: 17)

Cebador inverso: 5' GGA AGA ACC AGA AGC CAA AGA 3' (SEQ ID NO: 18)

- 30 Se separó el fragmento de ADNc de FcR $\gamma$  de 0,3 kb y se recuperó mediante electroforesis usando gel de agarosa al 2%, que se clonó en el vector de plásmido pCR4 Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen) usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen). Se analizaron las secuencias de bases de los genes obtenidos, y se confirmó que se clonó el gen de FcR $\gamma$  deseado mostrado en SEQ ID NO: 15.

- 35 B-4) Producción de vectores de expresión de FcR $\gamma$  etiquetados con Myc

- Se construyó un plásmido que expresa una proteína en la que se unió la etiqueta Myc al extremo C-terminal de modo que pudo confirmarse la expresión de la proteína FcR $\gamma$ . Se amplificó la secuencia deseada mediante un
- 40 método de PCR usando como molde el gen de FcR $\gamma$  producido tal como se describe en el punto 3) así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. Se usó 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) para la reacción PCR. Se fijaron las condiciones a 25 ciclos de PCR [a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 1 minuto] tras 1 ciclo de PCR a 94°C durante 2 minutos.

- 45 Cebador directo (SEQ ID NO: 19): 5' CCG ctc gag ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG 3'

Cebador inverso (SEQ ID NO: 20): 5' CTA Gac tag tCT A[CA GAT CCT CTT CAG AGA TGA GTT TCT GCT C] CT GTG GTG GTT TCT CAT G 3'

- 50 De las secuencias de cebadores mencionadas anteriormente, la parte destacada entre paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica para la etiqueta Myc unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Se escindieron por XhoI y SpeI los fragmentos de ADN amplificados por PCR, que entonces se separaron mediante electroforesis en gel. Se recuperaron fragmentos de ADN de aproximadamente 0,3 kb, que se ligaron en el vector pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera que se describió
- 55 anteriormente. Entonces, se construyó un plásmido que puede expresar la proteína de fusión deseada, es decir pME18X-Myc-FcR $\gamma$ .

### C. Expresión de ILT7 en células animales

- 60 Se examinó la expresión de ILT7 en células animales usando vectores de expresión producidos tal como se describió anteriormente.

#### C-1) Expresión en células 293T

- 65 Se introdujeron ADN que consisten en las siguientes cinco combinaciones en células 293T ( $7 \times 10^5$  células) usando el

kit de transfección Effectene (fabricado por Qiagen). Dos días tras la introducción, se llevó a cabo el análisis de citometría de flujo (análisis de FCM).

- 5 (1) 2 g de pME18X-N-FLAG ILT7  
 (2) 2 g de pME18X-C-FLAG ILT7  
 (3) 1 g de pME18X-N-FLAG ILT7 + 1 g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$   
 10 (4) 1 g de pME18X-C-FLAG ILT7 + 1 g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$   
 (5) 2 g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$

15 Se realizó el método de análisis de FCM de la misma manera que se describe en el punto A-4 del siguiente ejemplo 2. Se usó anticuerpo anti-FLAG conjugado con Cy3 (fabricado por Sigma) para la reacción y se usó un instrumento FACScan (fabricado por Becton Dickinson) para el análisis. Como resultado, se encontró que sólo se expresaba una pequeña cantidad de ILT7 en la superficie celular cuando se hizo reaccionar solo, mientras que se expresaba ILT7 de manera extracelular y robusta cuando coexistía con FcR $\gamma$  (figura 3). Se sabe que FcR $\gamma$  de ratón tiene alta homología con FcR $\gamma$  humano. Sin embargo, cuando se usaron células p815 (mastocitoma de ratón) que expresan FcR $\gamma$  de ratón como huéspedes, no pudo observarse la expresión de ILT7.

C-2) Análisis mediante inmunoprecipitación y método de inmunotransferencia de tipo Western

25 Se expresó ILT7 con FcR $\gamma$  acompañante en la superficie celular, que se confirmó tal como sigue. Tras la inmunoprecipitación, se analizaron diversos anticuerpos para cada célula 293T que se coexpresaba con ambos genes en las respectivas combinaciones descritas en los puntos (1) a (5). Se introdujeron los ADN en células 293T ( $7 \times 10^5$  células), a partir de lo cual se recuperaron células 293T dos días tras la introducción de la misma manera que se describe en el punto 1). Se disolvieron fraccionamientos celulares en tampón de lisis (Triton al 0,5%, NaCl 150 mM), que se dejó sobre hielo durante 20 minutos. Después de eso, se repitió la aspiración usando una aguja (27G) varias veces, seguido por centrifugación a 15 Krpm durante 20 minutos. Se añadió un anticuerpo anti-myc (2 g, fabricado por Santa Cruz Biotechnology) o anticuerpo anti-FLAG (2 g, fabricado por Sigma) a 200 g de lisado de los productos resultantes, que se agitaron adicionalmente mediante rotación a 4°C durante 4 horas. Entonces, se añadió a lo mismo mezcla de proteína A/G Sepharose 4 Fast Flow (fabricada por Amersham Bioscience), que se agitó mediante rotación a 4°C durante 1 hora. Entonces, se lavaron las fracciones precipitadas resultantes con tampón de lisis con la siguiente composición 3 veces. Tampón de lisis:

- 35 TritonX-100 al 0,5%,  
 40 HEPES 50 mM (pH 7,6),  
 NaCl 150 mM,  
 EDTA 1 mM,  
 45 glicerol al 10%,  
 DTT 1 mM,  
 50 PMSF 2 mM,  
 aprotinina 1 g/ml,  
 leupeptina 1 g/ml,  
 55 pepstatina A 1 g/ml,  
 quimostatina 0,1 g/ml,  
 60 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM,  
 glicerofosfato 0,1 mM.

65 Se añadió un tampón de muestra para SDS-PAGE a los precipitados lavados, que se sometió a ebullición durante 5 minutos y se centrifugó, seguido por la realización de la electroforesis con gel de SDS al 10%. Se transfirieron las muestras desde los geles tras la electroforesis a una membrana de PVDF (membrana de transferencia Immobilon-p:

fabricada por Millipore) según un método habitual. Se realizó la inmunotransferencia con anticuerpo anti-FLAG y anticuerpo anti-myc. Se confirmó que la ILT7 asociada con FcR $\gamma$  estaba presente en células 293T porque se observó su presencia en cada precipitado inmunitario (figura 4).

### 5 C-3) Análisis de la cadena de azúcar

10 Puesto que se observaron varias bandas de ILT7 en el análisis de tipo Western, se examinó la posibilidad de que ILT7 estuviese glicosilada. Se sometieron a inmunoprecipitación 200 g de lisado de células 293T que expresan N-FLAG ILT7 y Myc-FcR $\gamma$  con anticuerpo anti-FLAG de la manera descrita en los puntos 1) y 2). Después de eso, se suspendieron las fracciones precipitadas en 60 l de tampón de N-glicosidasa con la siguiente composición y se tomaron alícuotas de 30  $\mu$ l de cada disolución resultante en dos tubos. Tampón de N-glicosidasa:

EDTA 10 mM,

15 SDS al 0,2%,

TritonX100 al 0,5%,

20 2-mercaptoetanol al 1% en PBS (tampón fosfato).

Entonces, se añadieron 3 unidades de 3  $\mu$ l de N-glicosidasa (n.º 1365177, fabricada por Roche) a un tubo, que se hizo reaccionar a 37°C durante 15 horas. Además, se añadieron al mismo 7  $\mu$ l de tampón de muestra, que se calentó a 100°C durante 5 minutos, seguido por la realización de la electroforesis con gel de SDS al 10%. Tras la electroforesis, se transfirió el gel a una membrana de PVDF, a la que se le añadió 1  $\mu$ g de anticuerpo policlonal anti-ILT7 tal como se describe en el punto 4) y se hizo reaccionar a 4°C durante la noche. Se lavó el producto resultante con tampón TBS-T y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-conejo marcado con HRP diluido 100.000 veces (fabricado por Jackson) a temperatura ambiente. Entonces, se coloreó con el sistema de detección de inmunotransferencia de tipo Western de ECL (fabricado por Amersham Bioscience). Como resultado, disminuyó el peso molecular aparente al realizar el tratamiento con N-glicosidasa. Por tanto, se esperaba que se añadieran cadenas de azúcar a ILT7 (figura 5).

### 30 C-4) Producción de anticuerpo policlonal anti-ILT7

Se produjo el anticuerpo policlonal anti-ILT7 usado tal como se describe en el punto 3) tal como sigue. Se sintetizó químicamente un péptido de 23 aminoácidos correspondiente al extremo C-terminal de ILT7 (CSQEANSRKDNAPFRWEPWEQI; SEQ ID NO: 21) y se unió a proteína KLH que es un portador, y se usó el producto resultante como inmunógeno. Se inmunizaron por vía intradérmica conejos con inmunógeno mezclado con adyuvante completo de Freund. Tras seis inmunizaciones en total (una vez a la semana), se confirmó el aumento del título de anticuerpos en suero y entonces se recogió sangre completa. Entonces, se purificó por afinidad cierta cantidad de suero usando una columna de péptido de la misma secuencia. Se determinó el producto resultante como anticuerpo policlonal anti-ILT7.

## Ejemplo 2

### 45 A. Producción del anticuerpo monoclonal anti-ILT7

#### A-1) Producción de inmunógenos

Se prepararon células que iban a usarse como inmunógenos introduciendo genes en células 293T tal como se describe a continuación. Se añadieron 46,4  $\mu$ g de transgén (23,2  $\mu$ g de pME18X-C-FLAG ILT7 y 23,2 g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$ ) al fondo de una placa recubierta con colágeno de 100 mm (IWAKI) recubierta con 3 ml de opti-MEM (GIBCO) y se mezclaron. Posteriormente, aparte de la disolución de transgén, se diluyeron 58 l de Lipofectamine (nombre comercial) 2000 (Invitrogen) con 3 ml de opti-MEM, que se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos y se preparó una disolución de Lipofectamine. Después de eso, se añadió suavemente la disolución de Lipofectamine a la placa que contenía la disolución de transgén y se mezclaron. Tras estar en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos, se añadieron suavemente a la placa 10 ml de células 293T, diluidas hasta  $1 \times 10^6$  células/ml usando medio de cultivo DMEM (SIGMA) que contenía FBS (suero bovino fetal) al 10%. Se sometió el medio resultante a cultivo estático en un incubador a 37°C bajo CO<sub>2</sub> durante 48 horas, del que se recuperaron células mediante pipeteo. Se usaron las células obtenidas como transfectantes para inmunógenos.

#### 60 A-2) Producción de hibridomas

El día antes de que se inmunizaran con las células, se inyectaron 50 l de emulsión obtenida mezclando 200 l de PBS con 200 l de complete adyuvante (FREUND) (M606-1, fabricado por Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.) en las superficies plantares de ambas patas de cuatro ratones hembra Balb/c (de cuatro semanas de edad) para la inmunización. Al

día siguiente, se realizó la inmunización con 50 l de  $2 \times 10^7$  células suspendidas en 400 l de PBS. Se realizaron las inmunizaciones segunda y tercera cada cuatro días. Tres días tras la tercera inmunización, se realizó la fusión celular tal como sigue. Se recogieron células de ganglios linfáticos de patas de ratones inmunizados. Se mezclaron células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8-U1 cultivadas en medio de cultivo RPM11640 (SIGMA) que contenía FBS al 10% con las células derivadas de ganglios linfáticos y mieloma de modo que la razón de las células de mieloma de ratón con respecto a las células derivadas de ganglios linfáticos y mieloma debe ser de 2:1 a 10:1, a partir de lo cual se recuperaron células mediante centrifugación. Se añadió PEG4000 (MERCK) diluido de manera equivalente con medio de cultivo RPM1 1640 a las fracciones celulares obtenidas, que se sometieron a fusión celular. Tras lavar las células, se suspendió el producto resultante en 160 ml de medio HAT con FBS al 15% que contenía un complemento y entonces se inocularon en dieciséis placas de 96 pocillos a 200 l/pocillo. Se intercambié el medio de cultivo tras tres días. De una a dos semanas tras la observación de la formación de colonias, se realizó la selección primaria.

#### A-3) Selección de hibridoma mediante el método de ELISA celular

Se seleccionó un hibridoma, que produce anticuerpo diana, mediante el siguiente ELISA celular. Se usaron las células producidas tal como se describe en el punto 1) a  $1 \times 10^7$  células por placa de 96 pocillos, que se suspendieron en BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS y entonces se tomaron alícuotas en una placa para el ELISA celular (NUNC 249570 96V NW PS) a 100 l/pocillo. Se llevó a cabo la centrifugación a 2.000 rpm a 4°C y entonces se desechó el sobrenadante. Se añadió sobrenadante de cultivo muestreado a 50 µl/pocillo, que se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se llevó a cabo dos veces una operación de lavado que implica añadir BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS a cada pocillo, centrifugación a 2.000 rpm a 4°C durante 2 minutos y luego desechar el sobrenadante. Se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa diluido 10.000 veces (IM0819; Beckman Coulter) a cada pocillo tras el lavado, lo que se hizo reaccionar durante 30 minutos. Se llevó a cabo dos veces la operación de lavado usando BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS, seguido por la adición de una disolución colorante. Se sustituyó la disolución de anticuerpo preparada por PBS (-) mediante una membrana de diálisis (cortes de 10.000 fabricada por PIERCE) para dar anticuerpos quiméricos anti-ILT7 purificados.

#### A-4) Examen de la capacidad de respuesta de anticuerpo mediante análisis de citometría de flujo (FCM)

Se analizó el sobrenadante de cultivo de hibridomas mediante análisis de citometría de flujo (FCM). Se suspendieron las células producidas tal como se describe en el punto 1) en BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS, que se transfirió a un tubo de centrifuga a  $1 \times 10^5$  por una muestra, seguido por la adición de 40 l de cada cultivo y reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se llevó a cabo dos veces la operación de lavado que implica añadir 1 ml de BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS a cada tubo, centrifugar a 1200 rpm a 4°C durante 3 minutos y desechar el sobrenadante. Se añadieron 40 l de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con FITC diluido 100 veces (IM0819; Beckman Coulter) a cada pocillo tras lavar, lo que se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se llevó a cabo dos veces la operación de lavado usando BSA al 0,5%/EDTA 2 mM/PBS, seguido por análisis usando citometría de flujo FC500 (Beckman Coulter). Se seleccionó un hibridoma que producía un anticuerpo que no respondía sólo a la célula huésped y respondía específicamente en la que se había introducido el gen. Se clonó el hibridoma seleccionado mediante el método de dilución limitante y se obtuvieron los hibridomas #11 y #17 que producen anticuerpos monoclonales.

#### B. Examen de la capacidad de respuesta de anticuerpo anti-ILT7

Se coexpresó ILT7 en el que se unió la etiqueta FLAG al extremo N-terminal, con la molécula FcR $\gamma$  en células 293T de la misma manera que se describe en el punto C-1) del ejemplo 1. Entonces, se confirmó la capacidad de respuesta del anticuerpo obtenido en el ejemplo 2 mediante análisis de FCM usando FACScan (Becton Dickinson). Como resultado, se confirmó que todos los anticuerpos producidos por los hibridomas #11 y #17 que se obtuvieron tal como se describe en el punto A respondían a las células en las que se introdujo el gen de ILT7 y que expresaban ILT7 (figura 6 (b)). Además, se separaron linfocitos de sangre periférica humana usando Ficoll y entonces se realizó doble tinción con el anticuerpo anti-ILT7 producido y el anticuerpo anti-BDCA-2 marcado con PE (Miltenyi). Entonces, se examinó la capacidad de respuesta frente a los linfocitos. Como resultado, se detectó la unión del anticuerpo monoclonal producido por los hibridomas #11 y #17 a células positivas para BDCA-2. Es decir, se confirmó que ambos anticuerpos monoclonales reconocían moléculas de ILT7 expresadas en IPC humanas (figura 6 (a)). Estos anticuerpos monoclonales se designaron como anticuerpo anti-ILT7 #11 y anticuerpo anti-ILT7 #17, respectivamente. Se realizó un análisis más detallado.

Se llevó a cabo análisis de tinción múltiple para linfocitos de sangre periférica humanos usando el anticuerpo anti-ILT7 producido, anticuerpo anti-linaje 1 (anticuerpos anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD56; Becton Dickinson), el anticuerpo anti-CD123 (Becton Dickinson) y el anticuerpo anti-BDCA-2 (Miltenyi). Como para las fracciones positivas para anticuerpo frente a ILT7, el marcador de linaje era negativo, CD123 era positivo y BDCA-2 era positivo. A partir de los resultados, se confirmó que las IPC se tiñeron sólo por ILT7 #11 e ILT7 #17 (figura 7).

Además, se examinó la expresión de diversas moléculas mediante análisis de FCM cuando se estimularon linfocitos

de sangre periférica humanos mediante CpG o IFN $\alpha$  durante 24 horas. Se usó CpGODN2216 como CpGA, que induce la producción de IFN a partir de las IPC y se usó CpGODN2006 como CpGB que facilita la maduración de células dendríticas (Moseman *et al.* J. Immunology. 173, 4433-4442, 2004). Se fijó una compuerta para la fracción negativa para el marcador de linaje. Cuando se analizó la capacidad de respuesta del anticuerpo anti-BDCA-2 y el anticuerpo anti-ILT7 a la población de células positivas para CD123, la mayor parte de las fracciones positivas para ILT7 desaparecieron incluso tras 24 horas de estimulación con CpG. Por otro lado, algunas células de BDCA-2 mostraron ser positivas tras 24 horas de estimulación con CpG (figura 8). Se ha considerado que las IPC se diferencian en diferentes células inmediatamente tras la estimulación con CpG. Se indicó que el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención era útil como anticuerpo específico de fase frente a las IPC. Además, se confirmó que las IPC en los linfocitos de sangre periférica no se diferenciaban con la presencia de IFN $\alpha$ , en este caso cuando la razón de supervivencia era alta, se mantuvo la expresión de ILT7 en las IPC, además estaba presente ILT7 de manera estable en las IPC en enfermedades autoinmunitarias con la posibilidad de que IFN en suero estuviese a un alto nivel.

### 15 C. Examen de la especificidad de anticuerpo anti-ILT7

ILT7 pertenece a la familia de ILT/LIR y existe una pluralidad de moléculas con alta homología, particularmente con alta homología en la región extracelular (figura 9). Se ha notificado que los ARNm de moléculas, especialmente tales como ILT2 e ILT3 se expresan en las IPC (Ju *et al.* Gene 331, 159-164, 2004). Por tanto, se confirmó la capacidad de respuesta de estas moléculas usando células transgénicas.

#### C-1) Clonación de la molécula de ILT1 y producción de vectores de expresión

Se sintetizó ADNc a partir de ARN derivado de amígdala humana usando cebador de oligo dT y el sistema SuperScript Choice para el kit de síntesis de ADNc. A continuación, se ligó un adaptador de NotI en el vector pME18S escindido por NotI; dando como resultado la producción de una biblioteca de ADNc de amígdala humana.

Se amplificó el gen de ILT1 con una etiqueta FLAG en el extremo C-terminal mediante el método de PCR usando como molde la biblioteca de ADNc producida así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. Se usó 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) para la reacción PCR. Se fijaron las condiciones de reacción a 25 ciclos de PCR [a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 30 segundos y a 68°C durante 2 minutos] tras 1 ciclo de PCR a 94°C durante 2 minutos.

Cebador directo (SEQ ID NO: 22): 5' CCG ctc gag ATG ACC CCC ATC CTC ACG GTC C 3'

Cebador inverso (SEQ ID NO: 23): 5' CTA Gac tag tTC A[CT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT C]CC TCC CGG CTG CAT CTT G 3'

En las secuencias de cebadores mencionadas anteriormente, la parte destacada entre paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica para la etiqueta FLAG unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Se escindieron por XhoI y SpeI los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, que entonces se separaron mediante electroforesis en gel. Se recuperaron fragmentos de ADN de aproximadamente 2 kb, que se ligaron en el vector pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera que se describió anteriormente. Entonces, se construyó un plásmido que puede expresar la proteína de fusión deseada, es decir pME18X-C-FLAGILT1. La secuencia de bases y la secuencia de aminoácidos se muestran en SEQ ID NO: 24 y 25.

#### C-2) Producción de células que expresan y examen de la capacidad de respuesta de anticuerpo

Como para ILT2 (SEQ ID NO: 26) e ILT3 (SEQ ID NO: 28), se usaron vectores de expresión en los que se clonaron genes respectivos en sitios XbaI o XhoI de pDNAc4.1 (fabricado por Invitrogen). Se introdujeron los ADN de las siguientes combinaciones en células 293T ( $7 \times 10^5$  células) de la misma manera que se describe en el punto C-1). Dos días tras la introducción, se llevó a cabo el análisis de FCM y entonces se analizó el anticuerpo anti-ILT7.

(1) 1  $\mu$ g de pME18X-N-FLAG ILT7 + 1  $\mu$ g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$

(2) 0,5  $\mu$ g de pME18X-C-FLAG ILT1 + 0,5  $\mu$ g de pME18X-Myc-FcR $\gamma$  + 0,5  $\mu$ g de pDNAc4.1-ILT2 + 0,5  $\mu$ g de pDNAc4.1-ILT3

Como resultado, ningún anticuerpo respondió a las células en las que se expresó ILT1. Por este motivo, se sugirió que estas anticuerpos anti-ILT7 reconocían específicamente moléculas de ILT7 en las IPC (figura 10).

### Ejemplo 3

Efecto del anticuerpo anti-ILT7 sobre la capacidad para producir IFN humano

5 Se inocularon linfocitos de sangre periférica humanos en una placa de 96 pocillos a  $2 \times 10^5$  células/pocillo, que se hicieron reaccionar con 5 µg/ml de diversos anticuerpos a 37°C. Tras 1 hora de cultivo, se añadieron a los mismos virus Influenza PR8. Tras 24 horas de cultivo, se midió IFN $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo mediante el kit de ELISA (Bender Med System). Como resultado, se inhibió la producción de IFN mediante la adición de anticuerpo anti-ILT7 (figura 11). Concretamente, se encontró que la producción de IFN por las IPC se vio afectada por el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención.

Ejemplo 4

10 Actividad de CDC de anticuerpo anti-ILT7

*A. Producción del anticuerpo monoclonal anti-ILT7*

15 Se obtuvo un clon que produce un anticuerpo monoclonal de la misma manera que se describe en los puntos A-1) a A-4) del ejemplo 2. Se examinó la capacidad de respuesta de la misma manera que se describe en el punto B del ejemplo 2 y se examinó la especificidad de la misma manera que se describe en el punto C del ejemplo 2. Como resultado, se obtuvieron los hibridomas #37, #28 y #33, que producían anticuerpos monoclonales anti-ILT7 con buena capacidad de respuesta y especificidad. Se midió la actividad de CDC tal como se describe a continuación usando el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 en el que se produjeron tres clases de estos hibridomas.

20 *B. Determinación de la actividad de CDC*

B-1) El día previo de la producción de la diana

25 Producción de la línea celular diana (línea celular ILT7-CHO), se introdujo el siguiente ADN en células CHO-k1, que se inocularon para que fuesen  $6 \times 10^5$  células por placa (6 cm de  $\phi$ ) usando reactivo de transfección Effectene (fabricado por QLAGEN) y entonces se seleccionaron cepas resistentes usando 800 Lg/ml de Zeocin (fabricado por Invitrogen). ADN introducido: 1 µg de pDNAc3.1-C-FLAG ILT7 + 2 µg de pME18X-Myc FcR $\gamma$

30 Después de eso, se obtuvo una línea celular, que expresaba altamente ILT7, usando el clasificador de células (BD FACSAria, fabricado por Becton Dickinson). Se confirmó que la línea celular seleccionada expresaba altamente ILT7 mediante análisis de FCM. Se llevó a cabo la operación de análisis de FCM según el método tal como se describe en el punto A-4) del ejemplo 2 excepto porque se usó el instrumento BD FACSCaliber (fabricado por BD) para FCM. Se usaron los siguientes anticuerpos para un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, respectivamente.  
35 Anticuerpo primario: anticuerpo de ratón anti-ILT7 5 µg/ml (#37), anticuerpo secundario: anticuerpo policlonal de cabra específico anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con R-ficoeritrina (R-PE) (BD)

B-2) Respuesta de células diana a anticuerpos anti-ILT7

40 Se recuperaron las células diana obtenidas tal como se describe en el punto B-1) (células ILT7-CHO) usando disolución de EDTA 5 mM/PBS, que se suspendieron en medio de CDC con la siguiente composición para que fuese una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml. Se tomaron alícuotas de la suspensión en cada placa de 96 pocillos a 50 µl/pocillo.

45 Medio de CDC: RPMI1640

BSA al 0,1%

50 Penicilina 100 unidades/ml

Estreptomicina 100 µg/ml

Hepes 10 mM (pH 7,6)

55 L-glutamina 2 mM

Se añadieron 50 µl de disolución de anticuerpo anti-ILT7 preparada mediante medio de CDC a cada pocillo y se mezclaron de modo que la concentración final de anticuerpos debe ser de 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml y 5 µg/ml. Además, se añadieron a lo mismo 50 µl de medio de CDC que contenía un complemento con la siguiente  
60 composición y se mezclaron de modo que la concentración de complemento final debe ser del 6%, seguido por cultivo a 37°C durante 2 horas. Medio de CDC que contenía un complemento:

1 ml de medio de CDC (véase anteriormente) con complemento de conejo juvenil (n.º de catálogo: CL3441, fabricado por CEDARLANE).

65

Entonces, se centrifugó la suspensión (condición de centrifuga: a 250 G durante 4 minutos) y se recuperó el sobrenadante mientras que se prestaba atención para no contaminarlo con células. Se midió la LDH en el sobrenadante mediante un método habitual, que se determinó como “la cantidad de LDH que se escapaba de la célula diana por la actividad del complemento” (muestra experimental).

5

También se prepararon los siguientes parámetros con el fin de determinar la actividad de CDC.

Liberación de LDH espontánea de la célula diana: sólo se cultivaron células diana en el mismo volumen que la muestra y se prepararon.

10

Liberación de LDH máxima de la célula diana: sólo se cultivaron células diana en el mismo volumen que la muestra, y entonces se añadió a la misma la disolución de TritonX-100 incluida con el kit 60 minutos antes de la recuperación del sobrenadante de modo que la concentración final debe ser del 0,8% y se prepararon.

15

Control de corrección de volumen: se añadió la misma cantidad de TritonX-100 que la añadida cuando se preparó la liberación de LDH máxima de la célula diana, al medio de cultivo del mismo volumen que la muestra y se preparó.

Fondo de medio de cultivo: se prepararon el medio de cultivo del mismo volumen que la muestra y la disolución a la que se añadió medio de CDC que contenía complemento de modo que fuese el mismo volumen que la muestra.

20

Se restó el mismo volumen de medio de cultivo que la muestra de la absorbancia de la diana máxima y la diana espontánea. Se restó la disolución a la que se añadió medio de CDC que contenía complemento al medio de cultivo de modo que fuese el mismo volumen que la muestra, de la absorbancia de la muestra experimental y se corrigió. Se calculó la actividad de CDC mediante la siguiente ecuación. Se muestran los resultados en la tabla 1 y la figura 12. Incluso en el caso en el que se usaron anticuerpos monoclonales anti-ILT7 obtenidos de cualquier hibridoma, se presentaba el 80% o más de la actividad de CDC cuando la concentración de anticuerpo era de 0,5 µg/ml o más.

25

$$\text{Actividad de CDC (\%)} = \frac{61 \text{ muestra experimental} - \text{diana espontánea}}{\text{diana máxima} - \text{control de volumen} - \text{diana espontánea}} \times 100$$

30

Tabla 1

	Concentración de anticuerpo	Citotoxicidad (prom.)	Citotoxicidad (STD)
#37	0,1	14,78	3,16
	0,5	85,50	0,60
	1	86,13	2,93
	5	90,26	1,87
#28	0,1	18,52	0,60
	0,5	80,97	1,62
	1	83,64	1,99
	5	88,17	3,32
#33	0,1	4,42	1,58
	0,5	82,16	3,35
	1	85,39	2,78
	5	86,18	1,71
IgG2a de ratón	0,1	1,53	0,60
	0,5	1,47	2,50
	1	3,68	2,90
	5	3,06	1,72
Sin Ac	0	2,10	0,49

Ejemplo comparativo 1

35

Se realizó exactamente la misma operación de la misma manera que se describe en los puntos B y C del ejemplo 4 excepto porque se usó IgG2a de ratón en lugar de anticuerpo anti-ILT7. Se muestran los resultados en el ejemplo 4 así como la tabla 5 y la figura. No se observó actividad de CDC para las células diana en anticuerpos distintos del anticuerpo monoclonal anti-ILT7.

40

Ejemplos 5

Internalización de anticuerpo anti-ILT7 en células diana

A. Anticuerpo monoclonal anti-ILT7

45

Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales anti-ILT7. Anticuerpos monoclonales anti-ILT7: #17, #26, #37, #28 y #33

B. Observación de internalización

5 B-1) Producción de línea celular diana (línea celular ILT7-CHO)

Se produjo la línea celular diana (línea celular ILT7-CHO) de la misma manera que se describe en el punto B-1 del ejemplo 4.

10 B-2) Respuesta de células diana a anticuerpo anti-ILT7

Se suspendieron las células ILT7-CHO recuperadas en tampón (T(-) + FBS al 10%) enfriado con hielo con la siguiente composición a  $1 \times 10^6$  células/ml usando 5 mM de disolución de EDTA/PBS.

15 Medio T (-):

RPMI1640

20 Penicilina 100 unidades/ml

Estreptomicina 100 mg/ml

25 Hepes 10 mM (pH 7,6)

L-Glutamina 2 mM

Piruvato de sodio 1 mM

30 2-Mercaptoetanol 50 M

Suero bovino fetal inactivado por calor al 10%

35 Se colocó 1 ml de suspensión tal como se describió anteriormente en un tubo de centrifuga de 15 ml, que se centrifugó (condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos) y entonces se desechó el sobrenadante. Se añadieron 200 µl de suspensión de anticuerpo monoclonal anti-ILT7 (10 µg/ml) a los sedimentos celulares, que se mezclaron e incubaron a 4°C durante 30 minutos, seguido por lavado con medio T (-) enfriado con hielo dos veces (la cantidad del medio usada: 10 ml por lavado, condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos).

40 B-3) Modificación del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 presente en la superficie de células diana

Posteriormente, se modificó el complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 presente en la superficie de las células con un anticuerpo secundario, que estaba marcado con fluorescencia para su detección. Se describe a continuación el método específico. Se añadió anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón marcado con APC (número de catálogo: 550826BD, fabricado por Biosciences) que contenía medio T (-) enfriado con hielo a los sedimentos celulares obtenidos tal como se describe en el punto B-2), que se incubaron con sombreado a 4°C durante 20 minutos, seguido por lavado con medio T (-)enfriado con hielo dos veces (la cantidad del medio usada: 10 ml por lavado, condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos). Entonces, se añadió a lo mismo medio T (-) enfriado con hielo, que se usó como  $1 \times 10^6$  células/ml de suspensión.

B-4) Inducción de internalización mediante incubación a 37°C

55 Se dividió por igual la suspensión obtenida tal como se describe en el punto B-3 en dos tubos (es decir, tubos (a) y (b)). Se incubaron los tubos (a) y (b) a 37°C y 4°C, respectivamente, en condición de sombreado durante 60 minutos. Tras la incubación, se añadió a lo mismo FBS al 1%/PBS (enfriado con hielo) para detener la internalización. Se centrifugó la disolución resultante (condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos) y entonces se desechó el sobrenadante, seguido por lavado con el 1% de FBS/PBS (enfriado con hielo) dos veces (la cantidad de la disolución: 10 ml por lavado, condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos).

60 B-6) Modificación del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que permanece en la superficie de células diana tras la incubación

65 Se modificó el complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que permaneció en la superficie celular tras la incubación con un anticuerpo terciario para la detección mediante fluorescencia. Se describe a continuación el método específico. Se añadieron 20 µl de suspensión que contenía anticuerpos terciarios (anticuerpo de asno anti-

IgG de cabra marcado con FITC (número de catálogo: sc-2024, fabricado por Santa Cruz Biotechnology)) a los sedimentos celulares obtenidos tal como se describe en el punto B-4), que se mezclaron y se dejaron en reposo a 4°C durante 15 minutos en condición de sombreado. Se lavó la disolución resultante con (la cantidad de la disolución: 10 ml por lavado, condición de centrifuga: a 1200 rpm, a 4°C, durante 5 minutos).

B-5) Análisis del anticuerpo anti-ILT7 presente en células diana

Posteriormente, se añadieron 150 µl de FBS al 1%/PBS a los sedimentos celulares obtenidos tal como se describe en el punto B-5), que se suspendieron y recogieron en un tubo de microtitulación de 1,2 ml, seguido por la realización del análisis de FCM. En el análisis, se analizó por separado la intensidad de fluorescencia media (MPI) de cada célula en FITC y APC. Además, se calculó la razón de intensidad de fluorescencia (%) mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Razón de intensidad de fluorescencia (\%)} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia media de células incubadas a 37°C durante 60 minutos}}{\text{Intensidad de fluorescencia media de células incubadas a 4°C durante 6 minutos}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la tabla 2, la tabla 3 y la figura 13.

Tabla 2

	FITC			APC		
	Intensidad de fluorescencia media		Razón de intensidad de fluorescencia (%)	Intensidad de fluorescencia media		Razón de intensidad de fluorescencia (%)
	Temperatura de incubación (°C)			Temperatura de incubación (°C)		
4	37		4	4		
#17	35,7	15,9	44,5	1384	1320	95,4
#26	29,8	16,5	55,4	844	816	96,7
#37	51,0	28,5	55,9	2194	2155	98,2
#28	40,6	19,3	47,5	1746	1709	97,9
#33	47,7	22,6	47,4	1882	1845	98,0
IgG2a	3,7	4,2	116,2	3	3,64	121,3

	Especie de anticuerpos primarios	Razón de intensidad de fluorescencia (%)	
		APC	FITC
Ejemplo 5	Anticuerpo anti-ILT7 #17	95,4	44,5
	Anticuerpo anti-ILT7 #26	96,7	55,4
	Anticuerpo anti-ILT7 #37	98,2	55,9

Ejemplo comparativo 2	Anticuerpo anti-ILT7 #28	97,9	47,5
	Anticuerpo anti-ILT7 #33	98,0	47,4
	IgG2a de ratón	121,3	116,2

La intensidad de fluorescencia de FITC es un indicador de la cantidad del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que permanece en la superficie celular tras la incubación. La fluorescencia media, la intensidad de FITC en cuanto a las células incubadas a 37°C durante 60 minutos disminuyó en aproximadamente el 50% en comparación con las células incubadas a 4°C.

Por otro lado, la intensidad de fluorescencia de APC es un indicador de la cantidad del complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 presentado en la superficie celular antes de la incubación. El complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 se detecta independientemente de si está presente en la superficie celular o se incorpora en las células tras la incubación. En el ejemplo 5, la intensidad de fluorescencia de APC tras la incubación en el caso de incubación a 37°C era equivalente a la de en el caso de incubación a 4°C. Se muestra que el complejo inmunitario ILT7-anticuerpo anti-ILT7 puede estar presente en cualquier sitio de las células diana incluso cuando la incubación se realiza a cualquier temperatura. Tal como se mencionó anteriormente, se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 provocaba la internalización de ILT7 mediante la incubación a 37°C.

Ejemplo comparativo 2

Se realizó exactamente la misma operación de la misma manera que se describe en el ejemplo 5 excepto porque se usó IgG2a de ratón en lugar de anticuerpo anti-ILT7. Los resultados se muestran en el ejemplo 5 así como la tabla 2, la tabla 3 y la figura 13. En el caso en el que se usó la IgG2a de ratón, no se observó ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de FITC y APC, por tanto se encontró que la IgG2a de ratón no provocaba la internalización de ILT7.

Ejemplo 6

Acerca de la estructura del anticuerpo monoclonal de ratón anti-ILT7 humano [Secuencias de regiones variables]

5

A. Clonación de ADNc que codifica para la región variable de anticuerpo de ratón anti-ILT7

A-1) Acerca de hibridomas que producen anticuerpos de ratón anti-ILT7

10

Se usaron los siguientes hibridomas como hibridomas que producen anticuerpos de ratón anti-ILT7.

Hibridoma #11 (número de registro: FERM BP-1 0704)

Hibridoma #17 (número de registro: FERM BP-10705)

15

A-2) Aislamiento de los ARN totales

Se aislaron los ARN totales de los hibridomas descritos en el punto A-1) usando el kit disponible comercialmente "RNeasy Mini Kit" (número de catálogo: 74106, fabricado por Qiagen) según las instrucciones adjuntas al kit. En ambos casos, se obtuvieron aproximadamente 200 µg de los ARN totales a partir de  $1 \times 10^7$  hibridomas.

20

A-3) Amplificación y fragmentación de ADNc que codifica para una región variable de cadena pesada de ratón

Se amplificó ADNc que codifica para una región variable de cadena pesada de ratón mediante el método de 5' RACE usando 5 µg de los ARN totales aislados tal como se describe en el punto A-2. Como para la amplificación, se usó el kit disponible comercialmente "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ENDS, versión 2.0" (número de catálogo: 18374-058, fabricado por Invitrogen). Se describirá específicamente tal como sigue. En primer lugar, se sintetizó ADNc de primera hebra a partir de los ARN totales tal como se describe en el punto A-2) mediante transcriptasa inversa. Las secuencias de bases de cebadores antisentido (GSP1) usados en ese momento se muestran en la tabla 4.

25

30

Cebadores usados para la amplificación de un gen que codifica para una región variable de cadena pesada de ratón

Hibridomas usados	Nombres de cebadores	SEQ ID NO:	Secuencia
#11	Mu IgG3VH5RACE-GSP1	30	5' CCA TAG TTC CAT TTT ACA GTT ACC 3' (24 meros)
	Mu IgG3VH5RACE-GSP2	31	5' GGG ACC AAG GGA TAG ACA GA 3' (20 meros)
#17	Mu IgG2aVH5RACE-GSP1	32	5' TCC AGA GTT CCA GGT CAA GGT CAC 3' (24 meros)
	Mu IgG2aVH5RACE-GSP2	33	5' GCC AGT GGA TAG ACC GAT GG 3' (20 meros)

35

Posteriormente, se degradaron los ARN totales mediante ARNasaH y se purificó el ADNc de primera hebra que permanecía como una única hebra mediante un método de agarosa de bajo punto de fusión (al 1,5%). Además, se unió dC (es decir, homopolímero de nucleótido) al extremo 3'-terminal del ADNc de primera cadena usando desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Se amplificó el ADNc mediante un método de PCR usando cebadores de anclaje (SEQ ID NO: 34) que tienen un polímero de nucleótidos complementario a dC (secuencia de anclaje) en el extremo 3'-terminal y cebadores antisentido (GSP2) mostrados en la tabla 4. Además, se usaron como moldes los productos de PCR obtenidos. Se amplificó el ADNc mediante un método de PCR anidada usando el cebador AUAP (SEQ ID NO: 35) y los cebadores antisentido (GSP2) mostrados en la tabla 4. Además, se purificaron los productos de PCR mediante un método de agarosa de bajo punto de fusión (1,5%).

40

45

Cebador de anclaje para 5'RACE (SEQ ID NO: 34)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3' (36 meros)

50

Cebador AUAP para 5'RACE (SEQ ID NO: 35)

5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (20 meros)

A-4) Amplificación y fragmentación de ADNc que codifica para región variable de cadena ligera de ratón

55

Se amplificó ADNc que codifica para una región variable de cadena ligera de ratón a partir de los ARN totales aislados tal como se describe en el punto A-2) de la misma manera que se describe en el punto A-3). Las

secuencias de bases de cebadores usados en ese momento se muestran en la tabla 5. Se purificaron los productos de PCR obtenidos mediante un método de agarosa de bajo punto de fusión (1,5, tabla 5).

Cebadores usados para la amplificación de un gen que codifica para una región variable de cadena ligera de ratón

Hibridomas usados	Nombres de cebadores	SEQ ID No:	Secuencia
#11, #17	Mu IgVL5RACE-GSP1	36	5' TTC ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT 3' (24 meros)
Mu IgVL5RACE-GSP2	37	5' GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC 3' (21 meros)	

A-5) Confirmación de la secuencia de bases de ADNc y determinación de la región CDR

Se clonaron una región variable de cadena pesada obtenida tal como se describe en el punto A-3) y un fragmento de ADNc de región variable de cadena ligera obtenido tal como se describe en el punto A-4) en el vector pCR4 Blunt-TOPO usando el kit disponible comercialmente "kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO" (número de catálogo: 1325137, fabricado por Invitrogen) según las instrucciones adjuntas al kit, que entonces se introdujo en células competentes de *Escherichia coli* para dar transformante de *Escherichia coli*. Se obtuvo el plásmido mencionado anteriormente a partir del transformante, entonces se confirmó la secuencia de bases de ADNc en el plásmido usando el secuenciador automático de ADN "analizador genético ABI PRISM 3100 basado en PCR" (fabricado por Applied Biosystems). Se extrajeron las secuencias corregidas excluyendo transcritos obtenidos a partir de un ARN inactivo debido a mutaciones del marco de lectura y sin sentido alrededor de la región determinante de complementariedad (denominada a continuación en el presente documento "región CDR"). Además, se comparó la homología de la secuencia de bases de ADNc comprendida en el plásmido con la base de datos Kabat y se determinaron las secuencias de la región CDR y la región variable en las respectivas regiones variables. También, como para el hibridoma #37 producido en el ejemplo 4, se determinaron las secuencias de la región CDR y la región variable en regiones variables en el mismo procedimiento descrito en los puntos A-1) a A-5) del ejemplo 6 usando el hibridoma #17. Las secuencias de bases de ADNc de las regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos por cada hibridoma y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias se muestran en las siguientes SEQ ID NO.

	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
#11	SEQ ID NO: 38 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 40 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 39 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 41 (secuencia de aminoácidos)
#17	SEQ ID NO: 42 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 44 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 43 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 45 (secuencia de aminoácidos)
#37	SEQ ID NO: 46 (secuencia de bases)	SEQ ID NO: 48 (secuencia de bases)
	SEQ ID NO: 47 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 49 (secuencia de aminoácidos)

[Confirmación del isotipo de la región constante]

Como para el sobrenadante de cultivo de hibridomas, se confirmó el isotipo de la región constante del anticuerpo monoclonal producido usando un kit de isotipado de anticuerpo monoclonal de ratón disponible comercialmente (número de catálogo: MMT1, fabricado por Serotec Product). La región constante de cadena pesada de anticuerpo de ratón anti-ILT7 humano #11 era Ig 3 y la región constante de cadena ligera era Igk. Además, cada una de las regiones constantes de cadena pesada del anticuerpo de ratón anti-ILT7 humano #17 y anticuerpo de ratón anti-ILT7 humano #37 era Ig 2a y cada una de la región constante de cadena ligera era Igk.

Ejemplo 7

Producción de anticuerpos quiméricos

A. Clonación de ADNc que codifica para la región constante de IgG humana

Se seleccionaron la región constante de cadena pesada de IgG1 humana y la región constante de cadena ligera kappa de Ig humana a partir de una biblioteca de ADNc de IPC humanas. Entonces, se clonaron las regiones seleccionadas en el vector pCR4 Blunt-TOPO usando el kit disponible comercialmente "kit de clonación de PCR Zero Blunt TOPO" (número de catálogo: 1325137, fabricado por Invitrogen) según las instrucciones adjuntas al kit, que entonces se introdujo en células competentes de *Escherichia coli* para dar transformante de *Escherichia coli*. Se obtuvo el plásmido mencionado anteriormente a partir del transformante, entonces se confirmó la secuencia de bases de ADNc en el plásmido usando el secuenciador automático de ADN "analizador genético ABI PRISM 3100 basado en PCR" (fabricado por Applied Biosystems).

B. Ligamiento de región variable con región constante y clonación

Se usó el ADNc que codifica para la región constante de cadena pesada obtenido tal como se describe en el punto A y el ADNc que codifica para la región variable de cadena pesada obtenido tal como se describe en el punto A-5 del ejemplo 6, respectivamente. Ambos ADN tienen una región en la que se solapa una secuencia de bases de ADN.  
 5 Entonces, se obtuvo ADN bicatenario mediante el método de extensión del solapamiento usando la región. El procedimiento específico es tal como sigue.

C-1) Preparación de ADNc que codifica para la cadena pesada de anticuerpo quimérico frente a ILT7

10 Se digirió el “plásmido con ADNc que codifica para las regiones variables de cadena pesada de #11 y #17” que se obtuvo tal como se describe en el punto A-5) con las enzimas de restricción NotI y XbaI, que se purificó mediante el método de gel de agarosa (al 1,5%). Se disolvieron los productos resultantes en cada tampón TE con la siguiente composición para que fuese de 100 pmol/l para preparar una disolución del fragmento de ADNc que codifica para la  
 15 región variable de cadena pesada.

Tampón TE:

Tris-HCl 10 mM

20 EDTA 1 mM

pH de 7,5 a 8,0

25 Además, se trató el “plásmido con ADNc que codifica para la región constante de cadena pesada” obtenido tal como se describe en el punto B de la misma manera que se describió anteriormente para preparar 100 pmol/l de disolución. Posteriormente, se mezclaron ambas disoluciones y entonces se hibridaron ambas regiones de solapamiento manteniéndolas en primer lugar a 70°C durante 10 minutos y a continuación manteniéndolas a 37°C durante 5 minutos. Después de eso, se amplificó el ADNc mediante un método de PCR y se digirió el ADNc obtenido  
 30 con las enzimas restricción NotI y XbaI, que se purificó mediante un método de gel de agarosa de bajo punto de fusión (al 1,5%).

C-2) Preparación de ADNc que codifica para la cadena ligera de anticuerpo quimérico frente a ILT7

35 Se usó el ADNc que codifica para la región constante de cadena ligera obtenido tal como se describe en el punto A y el ADNc que codifica para la región variable de cadena ligera obtenido tal como se describe en el punto A-5 del ejemplo 6, respectivamente se obtuvo ADNc que codifica para la cadena ligera de anticuerpo quimérico frente a ILT7 de la misma manera que se describe en el punto C-1) usando estos ADNc.

C-3) Clonación

40 Se clonó el ADNc obtenido tal como se describe en el punto C-1) en el vector de plásmido pDNAc3.1-Zeocin (fabricado por Invitrogen) usando NotI y XbaI como sitios de clonación para producir un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo frente a ILT7 quimérico. Además, se clonó el ADNc obtenido tal como se describe en el punto C-2) en el vector de plásmido pDNAc3.1-hygromycin (fabricado por Invitrogen) usando NotI y XbaI como sitios  
 45 de clonación para producir un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico frente a ILT7. Los nombres de cada vector se muestran en la tabla 6.

Nombres de vectores de plásmido		
	Cadena pesada de anticuerpo frente a ILT7 para la expresión	Cadena ligera de anticuerpo frente a ILT7 para la expresión
#11	pcDNA-#11VH	pcDNA-#11VL
#17	pcDNA-#17VH	pcDNA-#17VL

D. Expresión de anticuerpo quimérico frente a ILT7

50 D-1) Transformación transitoria

Se cotransfectaron 1 µg de vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico frente a ILT7 y 1 µg de vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico frente a ILT7, que se obtuvieron tal como se describe en el punto C-3), en células 293T usando el kit de transfección Effectine (número de catálogo: 301427, fabricado por Qiagen). Después de eso, se cultivaron los productos resultantes a 37°C usando medio de cultivo DMEM con FBS de bajo contenido en IgG al 2% añadido con la siguiente composición.

60 Medio de cultivo DMEM con FBS de bajo contenido en IgG al 2% añadido:

## ES 2 526 079 T3

Medio de cultivo DMEM (número de catálogo: D5796, fabricado por Sigma)

FBS con bajo contenido en IgG al 2% (número de catálogo: SH30151.03, fabricado por HyClone)

5 L-Glutamina 2 mM

Penicilina 100 U/ml

10 Estreptomina 100 mg/ml

pH 7,2 a pH 7,4

15 Tras la introducción de los vectores, se cultivó el medio resultante durante 96 horas y se recogió el sobrenadante de cultivo. Entonces, se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación para dar una disolución de anticuerpo en bruto.

D-2) Transformación de homeostasis

20 Se cotransfectaron 1 µg de vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo quimérico frente a ILT7 y 1 g de vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico frente a ILT7, que se obtuvieron tal como se describe en el punto C-3), en células YB 2/0 (células derivadas de mieloma de rata, n.º de la ATCC CRL-1622) usando el kit de transfección Effectine (número de catálogo: 301427, fabricado por Qiagen). Entre los vectores de plásmido usados, el vector para la expresión de la cadena pesada es un marcador para resistencia a Zeocin y el vector para la expresión de la cadena ligera es un marcador para resistencia a higromicina. Por tanto, pueden hacerse crecer

25 células en las que se introdujeron ambos vectores en un medio de cultivo al que se añaden al mismo tiempo Zeocin e higromicina. Entonces, se cultivaron las células en medio de cultivo RPMI al que se añadieron Zeocin e higromicina y se seleccionó una cepa resistente.

30 Medio de cultivo RPMI con Zeocin-higromicina añadidas:

Medio de cultivo RPMI1640 (número de catálogo: R8758, fabricado por Sigma)

FBS al 10%

35 HEPES 0,01 M (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico)

Piruvato de sodio 1 mM

40 L-Glutamina 2 mM

Penicilina 100 U/ml

Estreptomina 100 µg/ml

45 2-Mercaptoetanol 55 µM

Zeocin 0,5 mg/ml

50 Higromicina 0,5 mg/ml

pH 7,2 a pH 7,4

55 Tres días después de eso, se determinó la cantidad de producción de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo mediante el método de ELISA. Se seleccionó una línea celular que producía anticuerpo quimérico frente a ILT7 con un alto nivel de expresión y células suficientemente aumentadas. Además, se realizó una única clonación de las líneas celulares seleccionadas mediante el método de clasificador de células método para obtener las siguientes líneas celulares.

60 #11 línea celular que produce anticuerpo quimérico frente a ILT7: línea celular #11-5 y

línea celular #11-16

línea celular #17

65 línea celular que produce anticuerpo quimérico frente a ILT7 #17: línea celular #17-24

Se cultivaron respectivamente las líneas celulares mencionadas anteriormente (línea celular #11-5, línea celular #11-16 y línea celular #17-24) en medio de cultivo RPMI con FBS al 5% añadido con la siguiente composición. La temperatura de incubación y el tiempo de incubación se fijaron a 37°C y 96 horas, respectivamente.

- 5 Medio de cultivo RPMI con FBS al 5% añadido:  
 Medio de cultivo RPMI1640 (número de catálogo: R8758S, fabricado por Sigma)  
 10 FBS al 5%  
 HEPES 0,01 M  
 15 Piruvato de sodio 1 mM  
 L-Glutamina 2 mM  
 Penicilina 100 U/ml  
 20 Estreptomicina 100 g/ml  
 2-Mercaptoetanol 55 M  
 pH 7,2 a pH 7,4  
 25 Se recogió el sobrenadante de cultivo y entonces se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación para dar una disolución de anticuerpo en bruto.

*E. Purificación de anticuerpos*

- 30 Se purificó cada una de las disoluciones de anticuerpos en bruto obtenidas tal como se describe en los puntos D-1 y D-2 mediante columna de afinidad de proteína A (rProtein A Sepharose FF, número de catálogo: 17-1279-01, fabricada por Amersham Pharmacia). Las condiciones de purificación son tal como sigue. Se llevó a cabo una purificación por afinidad usando tampón PBS (-) con la siguiente composición como tampón de adsorción y tampón citrato de sodio 0,1 M (pH 3) como tampón de elución según el manual de instrucciones adjunto. Se añadió Tris-HCl 1 M (pH 8,0) a las fracciones eluidas para ajustar el pH a alrededor de 7,2. Se midieron las DO a de 450 a 620 nm y entonces se seleccionaron los pocillos que muestran reacción positiva. Con referencia a la concentración de anticuerpos purificados, se determinó la absorbancia a 280 nm y se calculó basándose en 1,38 DO/mg/ml. Las relaciones entre los anticuerpos quiméricos frente a ILT7 obtenidos, los hibridomas a partir de los que se derivó el gen de la región variable y las células huésped se resumen en la tabla 7.

Tampón PBS (-):

- 45 Dihidrogenofosfato de monopotasio 0,2 g/l  
 Cloruro de potasio 0,2 g/l  
 Cloruro de sodio 8 g/l  
 50 Monohidrogenofosfato de disodio 1,15 g/l

Tabla 7

Anticuerpos quiméricos producidos

Nombres de los anticuerpos quiméricos producidos	Hibridomas usados	Forma de transformación	Células en las que se introducen
anticuerpo quimérico frente a ILT7 #11	#11	De manera transitoria	293T
anticuerpo quimérico frente a ILT7 #17	#17		
anticuerpo quimérico frente a ILT7 #11-5	#11	Homeostasis	YB 2/0
anticuerpo quimérico frente a ILT7 #11-16	#11		
anticuerpo quimérico frente a ILT7 #17-24	#17		

Se muestran a continuación, respectivamente, secuencias de bases de ADNc y secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos quiméricos producidos. En cada secuencia de aminoácidos, la

secuencia de aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta -1 es una secuencia señal y la secuencia de aminoácidos desde 1 hasta el extremo C-terminal es una secuencia de aminoácidos de una proteína madura. Es decir, las cadenas pesada y ligera, que constituyen estos anticuerpos quiméricos, consisten en la secuencia de aminoácidos desde 1 hasta el extremo C-terminal de cada una de las siguientes secuencias de aminoácidos.

5

	Cadena pesada	Cadena ligera
#11	SEQ ID NO: 50 (secuencia de bases) SEQ ID NO: 51 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 52 (secuencia de bases) SEQ ID NO: 53 (secuencia de aminoácidos)
#17	SEQ ID NO: 54 (secuencia de bases) SEQ ID NO: 55 (secuencia de aminoácidos)	SEQ ID NO: 56 (secuencia de bases) SEQ ID NO: 57 (secuencia de aminoácidos)

### Aplicabilidad industrial

10 La presente invención proporcionó el inmunógeno útil en la producción del anticuerpo que reconoce específicamente  
 15 ILT7 humano y el método para producir el anticuerpo anti-ILT7 usando el inmunógeno. El anticuerpo que reconoce  
 específicamente ILT7 humano de la presente invención reconoce específicamente ILT7 con la presencia de la  
 familia de ILT. Por tanto, el anticuerpo de la presente invención puede usarse para la detección y el aislamiento de  
 20 ILT7 humano. Por ejemplo, la localización de ILT7 también puede analizarse usando el anticuerpo de la presente  
 invención. Se considera que ILT7 es una molécula estrechamente relacionada con la diferenciación y función de las  
 IPC o células dendríticas. Por tanto, el anticuerpo, que reconoce ILT7 con alta especificidad, es útil para el análisis  
 de función de las IPC o células dendríticas. Se conocen células cancerígenas similares a IPC (que tienen la  
 característica en la que se expresa BDCA-2) (Chaper de L *et al.* Eur. J. Immunol. 34; 418-426, 2004, Maeda T *et al.*,  
 Int. J. Hematol. 81; 148-154, 2005). La confirmación de la expresión de ILT7 en estas células puede permitir el  
 diagnóstico de cáncer y un agente terapéutico.

En el caso de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, se señala la profunda relación entre IFN $\alpha$  producido por  
 las IPC y el desarrollo de psoriasis, que es una enfermedad de la piel (Nestle FO *et al.*, J. Exp. Med. 202, 135-143,  
 2005). Por tanto, puede examinarse la gravedad de psoriasis mediante la identificación de IPC en el tejido cutáneo  
 25 de pacientes con psoriasis, es decir en muestras de biopsia usando el anticuerpo anti-ILT7.

Se sabe que el desarrollo de SIDA en pacientes infectados por el VIH está correlacionado con el número de IPC.  
 Concretamente, se ha observado gran cantidad de las IPC en pacientes que no muestran síntomas y se ha  
 observado la reducción en las IPC en la aparición (Soumells V. *et al.*, Blood 98; 906-912, 2001). Por tanto, es eficaz  
 30 en la predicción del pronóstico de infección viral, tal como por VIH.

Por ejemplo, ILT7 es una molécula que se expresa específicamente en IPC humanas. Por tanto, el anticuerpo anti-  
 35 ILT7 de la presente invención puede usarse para detectar, identificar o aislar las IPC. Las IPC son células que  
 producen la mayor parte del interferón tipo 1. Por tanto, la detección, identificación o el aislamiento es un importante  
 objetivo en el diagnóstico y el estudio de enfermedades que implican interferón tipo 1. Como tales enfermedades,  
 pueden ilustrarse diversas enfermedades autoinmunitarias e infecciones en las que está implicado el interferón en la  
 formación del estado patológico.

Adicionalmente, el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención tiene el efecto inhibitor sobre la actividad de las  
 40 IPC. Por tanto, la actividad de las IPC puede inhibirse usando el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención.  
 Además, las enfermedades que implican interferón tipo 1 pueden tratarse mediante la inhibición de la actividad de  
 las IPC. Específicamente, el anticuerpo anti-ILT7 de la presente invención es útil para diversas enfermedades  
 autoinmunitarias e infecciones en las que está implicado el interferón en la formación del estado patológico.  
 45 Particularmente, puesto que el anticuerpo anti-ILT7 tiene una alta especificidad, puede eliminar las IPC de manera  
 eficaz.

### Lista de secuencias

50 <110> GINKGO BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.

<120> Anticuerpo anti-ILT7

<130> G2-A0501P

55 <150> Documento JP 2005-366465

<151> 20-12-2005

<160> 76

60 <170> PatentIn versión 3.3

```

<210> 1
<211> 1577
<212> ADN
<213> Homo sapiens
5
<220>
<221> CDS
<222> (24)..(1520)
10
<220>
<221> sig_peptide
<222> (24)..(71)
15
<220>
<221> mat_peptide
<222> (72)..(1520)

<400> 1
cagggccagg aggaggagat gcc atg acc ctc att ctc aca agc ctg ctc ttc      53
                               Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe
                               -15                               -10

ttt ggg ctg agc ctg ggc ccc agg acc cgg gtg cag gca gaa aac cta      101
Phe Gly Leu Ser Leu Gly Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu
   -5                               -1  1                               5                               10

ccc aaa ccc atc ctg tgg gcc gag cca ggt ccc gtg atc acc tgg cat      149
Pro Lys Pro Ile Leu Trp Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His
                               15                               20                               25

aac ccc gtg acc atc tgg tgt cag ggc acc ctg gag gcc cag ggg tac      197
Asn Pro Val Thr Ile Trp Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr
                               30                               35                               40

cgt ctg gat aaa gag gga aac tca atg tcg agg cac ata tta aaa aca      245
Arg Leu Asp Lys Glu Gly Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr
                               45                               50                               55

ctg gag tct gaa aac aag gtc aaa ctc tcc atc cca tcc atg atg tgg      293
Leu Glu Ser Glu Asn Lys Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp
   60                               65                               70

gaa cat gca ggg cga tat cac tgt tac tat cag agc cct gca ggc tgg      341
Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp
   75                               80                               85

tca gag ccc agc gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gcc tac agc aga      389
Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg
                               95                               100                               105

ccc acc ctg tcc gca ctg cca agc cct gtg gtg acc tca gga gtg aac      437
Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Val Asn

```

ES 2 526 079 T3

110					115					120						
gtg Val	acc Thr	ctc Leu 125	cgg Arg	tgt Cys	gcc Ala	tca Ser	cgg Arg 130	ctg Leu	gga Gly	ctg Leu	ggc Gly	agg Arg 135	ttc Phe	act Thr	ctg Leu	485
att Ile	gag Glu 140	gaa Glu	gga Gly	gac Asp	cac His	agg Arg 145	ctc Leu	tcc Ser	tgg Trp	acc Thr	ctg Leu 150	aac Asn	tca Ser	cac His	caa Gln	533
cac His 155	aac Asn	cat His	gga Gly	aag Lys	ttc Phe 160	cag Gln	gcc Ala	ctg Leu	ttc Phe	ccc Pro 165	atg Met	ggc Gly	ccc Pro	ctg Leu	acc Thr 170	581
ttc Phe	agc Ser	aac Asn	agg Arg	ggt Gly 175	aca Thr	ttc Phe	aga Arg	tgc Cys	tac Tyr 180	ggc Gly	tat Tyr	gaa Glu	aac Asn	aac Asn 185	acc Thr	629
cca Pro	tac Tyr	gtg Val	tgg Trp 190	tcg Ser	gaa Glu	ccc Pro	agt Ser	gac Asp 195	ccc Pro	ctg Leu	cag Gln	cta Leu 200	ctg Leu	gtg Val	tca Ser	677
ggc Gly	gtg Val	tct Ser 205	agg Arg	aag Lys	ccc Pro	tcc Ser	ctc Leu 210	ctg Leu	acc Thr	ctg Leu	cag Gln	ggc Gly 215	cct Pro	gtc Val	gtg Val	725
acc Thr	ccc Pro 220	gga Gly	gag Glu	aat Asn	ctg Leu	acc Thr 225	ctc Leu	cag Gln	tgt Cys	ggc Gly	tct Ser 230	gat Asp	gtc Val	ggc Gly	tac Tyr	773
atc Ile 235	aga Arg	tac Tyr	act Thr	ctg Leu	tac Tyr 240	aag Lys	gag Glu	ggg Gly	gcc Ala	gat Asp 245	ggc Gly	ctc Leu	ccc Pro	cag Gln	cgc Arg 250	821
cct Pro	ggc Gly	cgg Arg	cag Gln	ccc Pro 255	cag Gln	gct Ala	ggg Gly	ctc Leu	tcc Ser 260	cag Gln	gcc Ala	aac Asn	ttc Phe	acc Thr 265	ctg Leu	869
agc Ser	cct Pro	gtg Val	agc Ser 270	cgc Arg	tcc Ser	tac Tyr	ggg Gly	ggc Gly 275	cag Gln	tac Tyr	aga Arg	tgc Cys	tac Tyr 280	ggc Gly	gca Ala	917
cac His	aac Asn	gtc Val 285	tcc Ser	tcc Ser	gag Glu	tgg Trp 290	tcg Ser	gcc Ala	ccc Pro	agt Ser	gac Asp	ccc Pro 295	ctg Leu	gac Asp	atc Ile	965
ctg Leu	atc Ile 300	gca Ala	gga Gly	cag Gln	atc Ile	tct Ser 305	gac Asp	aga Arg	ccc Pro	tcc Ser	ctc Leu 310	tca Ser	gtg Val	cag Gln	ccg Pro	1013
ggc Gly 315	ccc Pro	acg Thr	gtg Val	acc Thr	tca Ser 320	gga Gly	gag Glu	aag Lys	gtg Val	acc Thr 325	ctg Leu	ctg Leu	tgt Cys	cag Gln	tca Ser 330	1061
tgg Trp	gac Asp	ccg Pro	atg Met	ttc Phe 335	act Thr	ttc Phe	ctt Leu	ctg Leu	acc Thr 340	aag Lys	gag Glu	ggg Gly	gca Ala	gcc Ala 345	cat His	1109
ccc Pro	ccg Pro	ttg Leu	cgf Arg 350	ctg Leu	aga Arg	tca Ser	atg Met	tac Tyr 355	gga Gly	gct Ala	cat His	aag Lys	tac Tyr 360	cag Gln	gct Ala	1157
gaa Glu	ttc Phe	ccc Pro 365	atg Met	agt Ser	cct Pro	gtg Val	acc Thr 370	tca Ser	gcc Ala	cac His	gcg Ala	ggg Gly 375	acc Thr	tac Tyr	agg Arg	1205
tgc Cys	tac Tyr	ggc Gly	tca Ser	cgc Arg	agc Ser	tcc Ser	aac Asn	ccc Pro	tac Tyr	ctg Leu	ctg Leu	tct Ser	cac His	ccc Pro	agt Ser	1253

ES 2 526 079 T3

380		385		390																		
gag	ccc	ctg	gag	ctc	gtg	gtc	tca	gga	gca	act	gag	acc	ctc	aat	cca						1301	
Glu	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Gly	Ala	Thr	Glu	Thr	Leu	Asn	Pro							410
395					400					405												
gca	caa	aag	aag	tca	gat	tcc	aag	act	gcc	cca	cac	ctc	cag	gat	tac							1349
Ala	Gln	Lys	Lys	Ser	Asp	Ser	Lys	Thr	Ala	Pro	His	Leu	Gln	Asp	Tyr							425
				415					420													
aca	gtg	gag	aat	ctc	atc	cgc	atg	ggt	gtg	gct	ggc	ttg	gtc	ctg	ctg							1397
Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Arg	Met	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Leu							440
			430					435														
ttc	ctc	ggg	att	ctg	tta	ttt	gag	gct	cag	cac	agc	cag	aga	agc	ccc							1445
Phe	Leu	Gly	Ile	Leu	Leu	Phe	Glu	Ala	Gln	His	Ser	Gln	Arg	Ser	Pro							
		445					450					455										
cca	agg	tgc	agc	cag	gag	gca	aac	agc	aga	aag	gac	aat	gca	ccc	ttc							1493
Pro	Arg	Cys	Ser	Gln	Glu	Ala	Asn	Ser	Arg	Lys	Asp	Asn	Ala	Pro	Phe							470
	460					465					470											
aga	gtg	gtg	gag	cct	tgg	gaa	cag	atc	tgatgatctg	aggaggttct												1540
Arg	Val	Val	Glu	Pro	Trp	Glu	Gln	Ile														475
					480																	
ggaagactgg	ggcagcagtt	ggggaagtgt	ctgctga																			1577

<210> 2  
 <211> 499  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2  
 Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe Phe Gly Leu Ser Leu Gly  
 -15 -10 -5 -1  
 Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu Pro Lys Pro Ile Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His Asn Pro Val Thr Ile Trp  
 20 25 30  
 Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly  
 35 40 45  
 Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr Leu Glu Ser Glu Asn Lys  
 50 55 60  
 Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr  
 65 70 75 80  
 His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro  
 85 90 95  
 Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg Pro Thr Leu Ser Ala Leu  
 100 105 110

ES 2 526 079 T3

Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Val Asn Val Thr Leu Arg Cys Ala  
 115 120 125

Ser Arg Leu Gly Leu Gly Arg Phe Thr Leu Ile Glu Glu Gly Asp His  
 130 135 140

Arg Leu Ser Trp Thr Leu Asn Ser His Gln His Asn His Gly Lys Phe  
 145 150 155 160

Gln Ala Leu Phe Pro Met Gly Pro Leu Thr Phe Ser Asn Arg Gly Thr  
 165 170 175

Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Glu Asn Asn Thr Pro Tyr Val Trp Ser Glu  
 180 185 190

Pro Ser Asp Pro Leu Gln Leu Leu Val Ser Gly Val Ser Arg Lys Pro  
 195 200 205

Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Val Thr Pro Gly Glu Asn Leu  
 210 215 220

Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr Ile Arg Tyr Thr Leu Tyr  
 225 230 235 240

Lys Glu Gly Ala Asp Gly Leu Pro Gln Arg Pro Gly Arg Gln Pro Gln  
 245 250 255

Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Ser Pro Val Ser Arg Ser  
 260 265 270

Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Val Ser Ser Glu  
 275 280 285

Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly Gln Ile  
 290 295 300

Ser Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Thr Ser  
 305 310 315 320

Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Asp Pro Met Phe Thr  
 325 330 335

Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Arg Leu Arg  
 340 345 350

Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro  
 355 360 365

Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Arg Ser  
 370 375 380

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu P<sup>ro</sup> Leu Glu Leu Val  
385 390 395 400

Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu Asn Pro Ala Gln Lys Lys Ser Asp  
405 410 415

Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn Leu Ile  
420 425 430

Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ile Leu Leu  
435 440 445

Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Pro Pro Arg Cys Ser Gln Glu  
450 455 460

Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val Val Glu Pro Trp  
465 470 475 480

Glu Gln Ile

- 5 <210> 3  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 10 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
<400> 3  
ctccaacccc tacctgctgt c 21
- 15 <210> 4  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 20 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
<400> 4  
ttccaaggc tccaccactc t 21
- 25 <210> 5  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 30 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
<400> 5  
cctcaatcca gcacaaaaga agt 23
- 35 <210> 6  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 40 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 6  
cggatgagat tctccactgt gtaa 24

5 <210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 7  
ccacccatgg caaattcc 18

15 <210> 8  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 8  
tgggatttcc attgatgaca ag 22

25 <210> 9  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

35 <400> 9  
cagggccagg aggaggagat g 21

<210> 10  
<211> 21

40 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

45 <400> 10  
tcagcagaca ctccccaac t 21

<210> 11  
<211> 105  
<212> ADN  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

55 <400> 11  
**ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc ctgctcttct ttgggctgag cctgggcgat 60**  
**tacaaggatg acgacgataa gcccaggacc cgggtgcagg cagaa 105**

60 <210> 12  
<211> 31  
<212> ADN

<213> Artificial

<220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

5 <400> 12  
 ctagactagt tcagatctgt tccaaggct c 31

10 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 13  
 ccgctcgaga tgacctcat ttcacaagc 30

20 <210> 14  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 14  
 ctagactagt tcactatcg tgcctatct tgtaatcga cgtgccaa ggctc 55

30 <210> 15  
 <211> 313  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (7)..(267)

40 <400> 15  
 cccaag atg att cca gca gtg gtc ttg ctc tta ctc ctt ttg gtt gaa 48  
 Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu  
 1 5 10

caa gca gcg gcc ctg gga gag cct cag ctc tgc tat atc ctg gat gcc 96  
 Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala  
 15 20 25 30

atc ctg ttt ctg tat gga att gtc ctc acc ctc ctc tac tgt cga ctg 144  
 Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu  
 35 40 45

aag atc caa gtg cga aag gca gct ata acc agc tat gag aaa tca gat 192  
 Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp  
 50 55 60

ggt gtt tac acg ggc ctg agc acc agg aac cag gag act tac gag act 240  
 Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr  
 65 70 75

ctg aag cat gag aaa cca cca cag tag ctttagaata gatgcgggtca 287  
 Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln  
 80 85

tattcttctt tggcttctgg ttcttc 313

<210> 16

<211> 86  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 16  
 Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu  
 20 25 30  
 Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile  
 35 40 45  
 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys  
 65 70 75 80  
 His Glu Lys Pro Pro Gln  
 85

10 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 17  
 cccaagatga ttccagcagt g 21

20 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 18  
 ggaagaacca gaagccaaag a 21

30 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 19  
 ccgctcgaga tgattccagc agtggctctg 30

40 <210> 20  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45

ES 2 526 079 T3

<220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

<400> 20  
ctagactagt ctacagatcc tcttcagaga tgagtttctg ctcctgtggt ggtttctcat 60

5 g 61

<210> 21  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> una secuencia peptídica sintetizada de manera artificial

15 <400> 21  
Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val  
1 5 10 15

Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile  
20

<210> 22  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

25 <400> 22  
ccgctcgaga tgaccccat cctcaggtc c 31

<210> 23  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial

35 <400> 23  
ctagactagt tcactatcg tgcctatcct tgtaaccct cccggctgca tcttg 55

<210> 24  
<211> 1425  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1425)

45

<400> 24

ES 2 526 079 T3

atg Met 1	acc Thr	ccc Pro	atc Ile	ctc Leu 5	acg Thr	gtc Val	ctg Leu	atc Ile	tgt Cys 10	ctc Leu	ggg Gly	ctg Leu	agt Ser	ctg Leu 15	ggc Gly	48
ccc Pro	agg Arg	acc Thr	cac His 20	gtg Val	cag Gln	gca Ala	ggg Gly	cac His 25	ctc Leu	ccc Pro	aag Lys	ccc Pro	acc Thr 30	ctc Leu	tgg Trp	96
gct Ala	gag Glu	cca Pro 35	ggc Gly	tct Ser	gtg Val	atc Ile 40	atc Ile	cag Gln	gga Gly	agt Ser	cct Pro	gtg Val 45	acc Thr	ctc Leu	agg Arg	144
tgt Cys	cag Gln 50	ggg Gly	agc Ser	ctt Leu	cag Gln	gct Ala 55	gag Glu	gag Glu	tac Tyr	cat His	cta Leu 60	tat Tyr	agg Arg	gaa Glu	aac Asn	192
aaa Lys 65	tca Ser	gca Ala	tcc Ser	tgg Trp	gtt Val 70	aga Arg	cgg Arg	ata Ile	caa Gln	gag Glu 75	cct Pro	ggg Gly	aag Lys	aat Asn	ggc Gly 80	240
cag Gln	ttc Phe	ccc Pro	atc Ile	cca Pro 85	tcc Ser	atc Ile	acc Thr	tgg Trp	gaa Glu 90	cac His	gca Ala	ggg Gly	cgg Arg	tat Tyr 95	cac His	288
tgt Cys	cag Gln	tac Tyr	tac Tyr 100	agc Ser	cac His	aat Asn	cac His	tca Ser 105	tca Ser	gag Glu	tac Tyr	agt Ser	gac Asp 110	ccc Pro	ctg Leu	336
gag Glu	ctg Leu	gtg Val 115	gtg Val	aca Thr	gga Gly	gcc Ala	tac Tyr 120	agc Ser	aaa Lys	ccc Pro	acc Thr	ctc Leu 125	tca Ser	gct Ala	ctg Leu	384
ccc Pro	agc Ser 130	cct Pro	gtg Val	gtg Val	acc Thr	tta Leu 135	gga Gly	ggg Gly	aac Asn	gtg Val	acc Thr 140	ctc Leu	cag Gln	tgt Cys	gtc Val	432
tca Ser 145	cag Gln	gtg Val	gca Ala	ttt Phe	gac Asp 150	ggc Gly	ttc Phe	att Ile	ctg Leu	tgt Cys 155	aag Lys	gaa Glu	gga Gly	gaa Glu	gat Asp 160	480
gaa Glu	cac His	cca Pro	caa Gln	cgc Arg 165	ctg Leu	aac Asn	tcc Ser	cat His	tcc Ser 170	cat His	gcc Ala	cgt Arg	ggg Gly	tgg Trp 175	tcc Ser	528
tgg Trp	gcc Ala	atc Ile	ttc Phe 180	tcc Ser	gtg Val	ggc Gly	ccc Pro	gtg Val 185	agc Ser	ccg Pro	agt Ser	cgc Arg	agg Arg 190	tgg Trp	tcg Ser	576
tac Tyr	agg Arg	tgc Cys 195	tat Tyr	gct Ala	tat Tyr	gac Asp	tcg Ser 200	aac Asn	tct Ser	ccc Pro	tat Tyr	gtg Val 205	tgg Trp	tct Ser	cta Leu	624
ccc Pro	agt Ser 210	gat Asp	ctc Leu	ctg Leu	gag Glu	ctc Leu 215	ctg Leu	gtc Val	cca Pro	ggt Gly	gtt Val 220	tct Ser	aag Lys	aag Lys	cca Pro	672
tca Ser 225	ctc Leu	tca Ser	gtg Val	cag Gln	cca Pro 230	ggt Gly	cct Pro	atg Met	gtg Val	gcc Ala 235	cct Pro	ggg Gly	gag Glu	agc Ser	ctg Leu 240	720
acc Thr	ctc Leu	cag Gln	tgt Cys	gtc Val	tct Ser	gat Asp	gtc Val	ggc Gly	tac Tyr	gac Asp	aga Arg	ttt Phe	gtt Val	ctg Leu	tat Tyr	768

ES 2 526 079 T3

245				250				255								
aag	gag	gga	gaa	cgt	gac	ttc	ctc	cag	cgc	cct	ggt	tgg	cag	ccc	cag	816
Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Pro	Gln	
			260					265					270			
gct	ggg	ctc	tcc	cag	gcc	aac	ttc	acc	ctg	ggc	cct	gtg	agc	ccc	tcc	864
Ala	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Asn	Phe	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Pro	Ser	
		275					280					285				
cac	ggg	ggc	cag	tac	aga	tgc	tac	agt	gca	cac	aac	ctc	tcc	tcc	gag	912
His	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Ser	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	
	290					295					300					
tgg	tcg	gcc	ccc	agt	gac	ccc	ctg	gac	atc	ctg	atc	aca	gga	cag	ttc	960
Trp	Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Ile	Leu	Ile	Thr	Gly	Gln	Phe	
305					310					315					320	
tat	gac	aga	ccc	tct	ctc	tcg	gtg	cag	ccg	gtc	ccc	aca	gta	gcc	cca	1008
Tyr	Asp	Arg	Pro	Ser	Leu	Ser	Val	Gln	Pro	Val	Pro	Thr	Val	Ala	Pro	
				325					330					335		
gga	aag	aac	gtg	acc	ctg	ctg	tgt	cag	tca	cgg	ggg	cag	ttc	cac	act	1056
Gly	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Cys	Gln	Ser	Arg	Gly	Gln	Phe	His	Thr	
			340					345					350			
ttc	ctt	ctg	acc	aag	gag	ggg	gca	ggc	cat	ccc	cca	ctg	cat	ctg	aga	1104
Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Glu	Gly	Ala	Gly	His	Pro	Pro	Leu	His	Leu	Arg	
		355					360					365				
tca	gag	cac	caa	gct	cag	cag	aac	cag	gct	gaa	ttc	cgc	atg	ggt	cct	1152
Ser	Glu	His	Gln	Ala	Gln	Gln	Asn	Gln	Ala	Glu	Phe	Arg	Met	Gly	Pro	
	370					375					380					
gtg	acc	tca	gcc	cac	gtg	ggg	acc	tac	aga	tgc	tac	agc	tca	ctc	agc	1200
Val	Thr	Ser	Ala	His	Val	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ser	
385					390					395				400		
tcc	aac	ccc	tac	ctg	ctg	tct	ctc	ccc	agt	gac	ccc	ctg	gag	ctc	gtg	1248
Ser	Asn	Pro	Tyr	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	
				405					410					415		
gtc	tca	gca	tcc	cta	ggc	caa	cac	ccc	cag	gat	tac	aca	gtg	gag	aat	1296
Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	His	Pro	Gln	Asp	Tyr	Thr	Val	Glu	Asn	
			420					425					430			
ctc	atc	cgc	atg	ggt	gtg	gct	ggc	ttg	gtc	ctg	gtg	gtc	ctc	ggg	att	1344
Leu	Ile	Arg	Met	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Val	Leu	Val	Val	Leu	Gly	Ile	
		435					440					445				
ctg	cta	ttt	gag	gct	cag	cac	agc	cag	aga	agc	cta	caa	gat	gca	gcc	1392
Leu	Leu	Phe	Glu	Ala	Gln	His	Ser	Gln	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Ala	Ala	
	450					455					460					
ggg	agg	gat	tac	aag	gat	gac	gac	gat	aag	tga						1425
Gly	Arg	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys							
465					470											

<210> 25  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 25  
 Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

ES 2 526 079 T3

Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30  
 Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
 35 40 45  
 Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn  
 50 55 60  
 Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His  
 85 90 95  
 Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu  
 100 105 110  
 Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu  
 115 120 125  
 Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val  
 130 135 140  
 Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser  
 165 170 175  
 Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser  
 180 185 190  
 Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu  
 195 200 205  
 Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr  
 245 250 255  
 Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln  
 260 265 270  
 Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser  
 275 280 285

His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu  
 290 295 300

Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe  
 305 310 315 320

Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro  
 325 330 335

Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr  
 340 345 350

Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg  
 355 360 365

Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro  
 370 375 380

Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser  
 385 390 395 400

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val  
 405 410 415

Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn  
 420 425 430

Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile  
 435 440 445

Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala  
 450 455 460

Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 465 470

<210> 26  
 <211> 1953  
 5 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 10 <221> CDS  
 <222> (1)..(1953)

<400> 26  
 atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc 48  
 Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

ccc cgg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg 96  
 Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30

ES 2 526 079 T3

gct Ala	gaa Glu	cca Pro 35	ggc Gly	tct Ser	gtg Val	atc Ile 40	acc Thr	cag Gln	ggg Gly	agt Ser	cct Pro	gtg Val 45	acc Thr	ctc Leu	agg Arg	144
tgt Cys	cag Gln 50	ggg Gly	ggc Gly	cag Gln	gag Glu	acc Thr 55	cag Gln	gag Glu	tac Tyr	cgt Arg	cta Leu 60	tat Tyr	aga Arg	gaa Glu	aag Lys	192
aaa Lys 65	aca Thr	gca Ala	ccc Pro	tgg Trp 70	att Ile 70	aca Thr	cgg Arg	atc Ile	cca Pro	cag Gln 75	gag Glu	ctt Leu	gtg Val	aag Lys 80	aag Lys 80	240
ggc Gly	cag Gln	ttc Phe	ccc Pro	atc Ile 85	cca Pro	tcc Ser	atc Ile	acc Thr	tgg Trp 90	gaa Glu	cat His	gca Ala	ggg Gly	cgg Arg 95	tat Tyr	288
cgc Arg	tgt Cys	tac Tyr 100	tat Tyr 100	ggt Gly	agc Ser	gac Asp	act Thr	gca Ala 105	ggc Gly	cgc Arg	tca Ser	gag Glu	agc Ser 110	agt Ser	gac Asp	336
ccc Pro	ctg Leu	gag Glu 115	ctg Leu	gtg Val	gtg Val	aca Thr	gga Gly 120	gcc Ala	tac Tyr	atc Ile	aaa Lys	ccc Pro 125	acc Thr	ctc Leu	tca Ser	384
gcc Ala	cag Gln 130	ccc Pro	agc Ser	ccc Pro	gtg Val 135	gtg Val 135	aac Asn	tca Ser	gga Gly	ggg Gly	aat Asn 140	gta Val	acc Thr	ctc Leu	cag Gln	432
tgt Cys 145	gac Asp	tca Ser	cag Gln	gtg Val 150	gca Ala 150	ttt Phe	gat Asp	ggc Gly	ttc Phe	att Ile 155	ctg Leu	tgt Cys	aag Lys	gaa Glu	gga Gly 160	480
gaa Glu	gat Asp	gaa Glu	cac His	cca Pro 165	caa Gln	tgc Cys	ctg Leu	aac Asn	tcc Ser 170	cag Gln	ccc Pro	cat His	gcc Ala	cgt Arg 175	ggg Gly	528
tcg Ser	tcc Ser	cgc Arg	gcc Ala 180	atc Ile	ttc Phe	tcc Ser	gtg Val	ggc Gly 185	ccc Pro	gtg Val	agc Ser	ccg Pro	agt Ser 190	cgc Arg	agg Arg	576
tgg Trp	tgg Trp	tac Tyr 195	agg Arg	tgc Cys	tat Tyr	gct Ala	tat Tyr 200	gac Asp	tcg Ser	aac Asn	tct Ser	ccc Pro 205	tat Tyr	gag Glu	tgg Trp	624
tct Ser	cta Leu 210	ccc Pro	agt Ser	gat Asp	ctc Leu	ctg Leu 215	gag Glu	ctc Leu	ctg Leu	gtc Val	cta Leu 220	ggt Gly	gtt Val	tct Ser	aag Lys	672
aag Lys 225	cca Pro	tca Ser	ctc Leu	tca Ser	gtg Val 230	cag Gln	cca Pro	ggt Gly	cct Pro	atc Ile 235	gtg Val	gcc Ala	cct Pro	gag Glu	gag Glu 240	720
acc Thr	ctg Leu	act Thr	ctg Leu	cag Gln 245	tgt Cys	ggc Gly	tct Ser	gat Asp	gct Ala 250	ggc Gly	tac Tyr	aac Asn	aga Arg	ttt Phe 255	gtt Val	768
ctg Leu	tat Tyr	aag Lys	gac Asp 260	ggg Gly	gaa Glu	cg Arg	gac Asp	ttc Phe 265	ctt Leu	cag Gln	ctc Leu	gct Ala	ggc Gly 270	gca Ala	cag Gln	816
ccc Pro	cag Gln 275	gct Ala	ggg Gly	ctc Leu	tcc Ser	cag Gln	gcc Ala 280	aac Asn	ttc Phe	acc Thr	ctg Leu	ggc Gly 285	cct Pro	gtg Val	agc Ser	864
cgc Arg	tcc Ser 290	tac Tyr	ggg Gly	ggc Gly	cag Gln	tac Tyr 295	aga Arg	tgc Cys	tac Tyr	ggt Gly	gca Ala 300	cac His	aac Asn	ctc Leu	tcc Ser	912

ES 2 526 079 T3

tcc Ser 305	gag Glu	tgg Trp	tcg Ser	gcc Ala	ccc Pro	agc Ser	gac Asp	ccc Pro	ctg Leu	gac Asp	atc Ile	ctg Leu	atc Ile	gca Ala	gga Gly	320	960
cag Gln	ttc Phe	tat Tyr	gac Asp	aga Arg	gtc Val	tcc Ser	ctc Leu	tcg Ser	gtg Val	cag Gln	ccg Pro	ggc Gly	ccc Pro	acg Thr	gtg Val	335	1008
gcc Ala	tca Ser	gga Gly	gag Glu	aac Asn	gtg Val	acc Thr	ctg Leu	ctg Leu	tgt Cys	cag Gln	tca Ser	cag Gln	gga Gly	tgg Trp	atg Met	350	1056
caa Gln	act Thr	ttc Phe	ctt Leu	ctg Leu	acc Thr	aag Lys	gag Glu	ggg Gly	gca Ala	gct Ala	gat Asp	gac Asp	cca Pro	tgg Trp	cgt Arg	365	1104
cta Leu	aga Arg	tca Ser	acg Thr	tac Tyr	caa Gln	tct Ser	caa Gln	aaa Lys	tac Tyr	cag Gln	gct Ala	gaa Glu	ttc Phe	ccc Pro	atg Met	375	1152
ggt Gly	cct Pro	gtg Val	acc Thr	tca Ser	gcc Ala	cat His	gcg Ala	ggg Gly	acc Thr	tac Tyr	agg Arg	tgc Cys	tac Tyr	ggc Gly	tca Ser	400	1200
cag Gln	agc Ser	tcc Ser	aaa Lys	ccc Pro	tac Tyr	ctg Leu	ctg Leu	act Thr	cac His	ccc Pro	agt Ser	gac Asp	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	415	1248
ctc Leu	gtg Val	gtc Val	tca Ser	gga Gly	ccg Pro	tct Ser	ggg Gly	ggc Gly	ccc Pro	agc Ser	tcc Ser	ccg Pro	aca Thr	aca Thr	ggc Gly	425	1296
ccc Pro	acc Thr	tcc Ser	aca Thr	tct Ser	ggc Gly	cct Pro	gag Glu	gac Asp	cag Gln	ccc Pro	ctc Leu	acc Thr	ccc Pro	acc Thr	ggg Gly	440	1344
tcg Ser	gat Asp	ccc Pro	cag Gln	agt Ser	ggt Gly	ctg Leu	gga Gly	agg Arg	cac His	ctg Leu	ggg Gly	ggt Val	gtg Val	atc Ile	ggc Gly	455	1392
atc Ile	ttg Leu	gtg Val	gcc Ala	gtc Val	atc Ile	cta Leu	ctg Leu	ctc Leu	ttc Phe	470	1440						
ctc Leu	atc Ile	ctc Leu	cga Arg	cat His	cga Arg	cgt Arg	cag Gln	ggc Gly	aaa Lys	cac His	tgg Trp	aca Thr	tcg Ser	acc Thr	cag Gln	485	1488
aga Arg	aag Lys	gct Ala	gat Asp	ttc Phe	caa Gln	cat His	cct Pro	gca Ala	ggg Gly	gct Ala	gtg Val	ggg Gly	cca Pro	gag Glu	ccc Pro	500	1536
aca Thr	gac Asp	aga Arg	ggc Gly	ctg Leu	cag Gln	tgg Trp	agg Arg	tcc Ser	agc Ser	cca Pro	gct Ala	gcc Ala	gat Asp	gcc Ala	cag Gln	515	1584
gaa Glu	gaa Glu	aac Asn	ctc Leu	tat Tyr	gct Ala	gcc Ala	gtg Val	aag Lys	cac His	aca Thr	cag Gln	cct Pro	gag Glu	gat Asp	ggg Gly	530	1632
gtg Val	gag Glu	atg Met	gac Asp	act Thr	cgg Arg	agc Ser	cca Pro	cac His	gat Asp	gaa Glu	gac Asp	ccc Pro	cag Gln	gca Ala	gtg Val	550	1680
acg Thr	tat Tyr	gcc Ala	gag Glu	gtg Val	aaa Lys	cac His	tcc Ser	aga Arg	cct Pro	agg Arg	aga Arg	gaa Glu	atg Met	gcc Ala	tct Ser	565	1728

cct cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag 1776  
 Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln  
 580 585 590

gcg gaa gag gac agg cag atg gac act gag gct gct gca tct gaa gcc 1824  
 Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser Glu Ala  
 595 600 605

ccc cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg 1872  
 Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg  
 610 615 620

aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa ggg ccc tct cca gct gtg 1920  
 Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val  
 625 630 635 640

ccc agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tag 1953  
 Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His

<210> 27  
 <211> 650  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 27  
 Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
 35 40 45

Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys  
 50 55 60

Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys  
 65 70 75 80

Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp  
 100 105 110

Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser  
 115 120 125

Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln  
 130 135 140

Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly  
 145 150 155 160

ES 2 526 079 T3

Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly  
 165 170 175  
 Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg  
 180 185 190  
 Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp  
 195 200 205  
 Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys  
 210 215 220  
 Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val  
 245 250 255  
 Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln  
 260 265 270  
 Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser  
 275 280 285  
 Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser  
 290 295 300  
 Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val  
 325 330 335  
 Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met  
 340 345 350  
 Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg  
 355 360 365  
 Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met  
 370 375 380  
 Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu  
 405 410 415  
 Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly  
 420 425 430

Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly  
 435 440 445

Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly  
 450 455 460

Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 465 470 475 480

Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln  
 485 490 495

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro  
 500 505 510

Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln  
 515 520 525

Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly  
 530 535 540

Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val  
 545 550 555 560

Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser  
 565 570 575

Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln  
 580 585 590

Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala  
 595 600 605

Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg  
 610 615 620

Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val  
 625 630 635 640

Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
 645 650

<210> 28  
 <211> 1347  
 5 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(1347)

<400> 28

ES 2 526 079 T3

atg Met 1	atc Ile	ccc Pro	acc Thr	ttc Phe 5	acg Thr	gct Ala	ctg Leu	ctc Leu	tgc Cys 10	ctc Leu	ggg Gly	ctg Leu	agt Ser	ctg Leu 15	ggc Gly	48
ccc Pro	agg Arg	acc Thr	gac Asp 20	atg Met	cag Gln	gca Ala	ggg Gly	ccc Pro 25	ctc Leu	ccc Pro	aaa Lys	ccc Pro 30	acc Thr	ctc Leu	tgg Trp	96
gct Ala	gag Glu	cca Pro 35	ggc Gly	tct Ser	gtg Val	atc Ile	agc Ser 40	tgg Trp	ggg Gly	aac Asn	tct Ser	gtg Val 45	acc Thr	atc Ile	tgg Trp	144
tgt Cys 50	cag Gln	ggg Gly	acc Thr	ctg Leu	gag Glu	gct Ala 55	cgg Arg	gag Glu	tac Tyr	cgt Arg	ctg Leu 60	gat Asp	aaa Lys	gag Glu	gaa Glu	192
agc Ser 65	cca Pro	gca Ala	ccc Pro	tgg Trp	gac Asp 70	aga Arg	cag Gln	aac Asn	cca Pro	ctg Leu 75	gag Glu	ccc Pro	aag Lys	aac Asn	aag Lys 80	240
gcc Ala	aga Arg	ttc Phe	tcc Ser	atc Ile 85	cca Pro	tcc Ser	atg Met	aca Thr	gag Glu 90	gac Asp	tat Tyr	gca Ala	ggg Gly	aga Arg 95	tac Tyr	288
cgc Arg	tgt Cys	tac Tyr	tat Tyr 100	cgc Arg	agc Ser	cct Pro	gta Val	ggc Gly 105	tgg Trp	tca Ser	cag Gln	ccc Pro	agt Ser 110	gac Asp	ccc Pro	336
ctg Leu	gag Glu	ctg Leu 115	gtg Val	atg Met	aca Thr	gga Gly	gcc Ala 120	tac Tyr	agt Ser	aaa Lys	ccc Pro	acc Thr 125	ctt Leu	tca Ser	gcc Ala	384
ctg Leu 130	ccg Pro	agt Ser	cct Pro	ctt Leu	gtg Val	acc Thr 135	tca Ser	gga Gly	aag Lys	agc Ser	gtg Val 140	acc Thr	ctg Leu	ctg Leu	tgt Cys	432
cag Gln 145	tca Ser	cgg Arg	agc Ser	cca Pro	atg Met 150	gac Asp	act Thr	ttc Phe	ctt Leu 155	ctg Leu 155	atc Ile	aag Lys	gag Glu	cgg Arg	gca Ala 160	480
gcc Ala	cat His	ccc Pro	cta Leu 165	ctg Leu 165	cat His	ctg Leu	aga Arg	tca Ser	gag Glu 170	cac His	gga Gly	gct Ala	cag Gln	cag Gln 175	cac His	528
cag Gln	gct Ala	gaa Glu	ttc Phe 180	ccc Pro	atg Met	agt Ser	cct Pro	gtg Val 185	acc Thr	tca Ser	gtg Val	cac His	ggg Gly 190	ggg Gly	acc Thr	576
tac Tyr	agg Arg	tgc Cys 195	ttc Phe	agc Ser	tca Ser	cac His	ggc Gly 200	ttc Phe	tcc Ser	cac His	tac Tyr	ctg Leu 205	ctg Leu	tca Ser	cac His	624
ccc Pro	agt Ser 210	gac Asp	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	ctc Leu 215	ata Ile	gtc Val	tca Ser	gga Gly	tcc Ser 220	ttg Leu	gag Glu	ggt Gly	ccc Pro	672
agg Arg 225	ccc Pro	tca Ser	ccc Pro	aca Thr	agg Arg 230	tcc Ser	gtc Val	tca Ser	aca Thr	gct Ala 235	gca Ala	ggc Gly	cct Pro	gag Glu	gac Asp 240	720
cag Gln	ccc Pro	ctc Leu	atg Met	cct Pro 245	aca Thr	ggg Gly	tca Ser	gtc Val	ccc Pro 250	cac His	agt Ser	ggt Gly	ctg Leu	aga Arg 255	agg Arg	768
cac His	tgg Trp	gag Glu	gta Val 260	ctg Leu	atc Ile	ggg Gly	gtc Val	ttg Leu 265	gtg Val	gtc Val	tcc Ser	atc Ile	ctg Leu 270	ctt Leu	ctc Leu	816

tcc	ctc	ctc	ctc	ttc	ctc	ctc	ctc	caa	cac	tgg	cgt	cag	gga	aaa	cac	864
Ser	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Gln	His	Trp	Arg	Gln	Gly	Lys	His	
		275					280					285				
agg	aca	ttg	gcc	cag	aga	cag	gct	gat	ttc	caa	cgt	cct	cca	ggg	gct	912
Arg	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Gln	Ala	Asp	Phe	Gln	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	
	290					295					300					
gcc	gag	cca	gag	ccc	aag	gac	ggg	ggc	cta	cag	agg	agg	tcc	agc	cca	960
Ala	Glu	Pro	Glu	Pro	Lys	Asp	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	
305					310					315					320	
gct	gct	gac	gtc	cag	gga	gaa	aac	ttc	tgt	gct	gcc	gtg	aag	aac	aca	1008
Ala	Ala	Asp	Val	Gln	Gly	Glu	Asn	Phe	Cys	Ala	Ala	Val	Lys	Asn	Thr	
				325					330					335		
cag	cct	gag	gac	ggg	gtg	gaa	atg	gac	act	cgg	cag	agc	cca	cac	gat	1056
Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	Val	Glu	Met	Asp	Thr	Arg	Gln	Ser	Pro	His	Asp	
			340					345					350			
gaa	gac	ccc	cag	gca	gtg	acg	tat	gcc	aag	gtg	aaa	cac	tcc	aga	cct	1104
Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Val	Thr	Tyr	Ala	Lys	Val	Lys	His	Ser	Arg	Pro	
		355					360					365				
agg	aga	gaa	atg	gcc	tct	cct	ccc	tcc	cca	ctg	tct	ggg	gaa	ttc	ctg	1152
Arg	Arg	Glu	Met	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Leu	
	370					375					380					
gac	aca	aag	gac	aga	cag	gca	gaa	gag	gac	aga	cag	atg	gac	act	gag	1200
Asp	Thr	Lys	Asp	Arg	Gln	Ala	Glu	Glu	Asp	Arg	Gln	Met	Asp	Thr	Glu	
385					390					395					400	
gct	gct	gca	tct	gaa	gcc	ccc	cag	gat	gtg	acc	tac	gcc	cgg	ctg	cac	1248
Ala	Ala	Ala	Ser	Glu	Ala	Pro	Gln	Asp	Val	Thr	Tyr	Ala	Arg	Leu	His	
				405					410					415		
agc	ttt	acc	ctc	aga	cag	aag	gca	act	gag	cct	cct	cca	tcc	cag	gaa	1296
Ser	Phe	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Ala	Thr	Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	
			420					425					430			
ggg	gcc	tct	cca	gct	gag	ccc	agt	gtc	tat	gcc	act	ctg	gcc	atc	cac	1344
Gly	Ala	Ser	Pro	Ala	Glu	Pro	Ser	Val	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Ile	His	
		435					440					445				
taa																1347

<210> 29  
 <211> 448  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29  
 Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30  
 Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp  
 35 40 45  
 Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu  
 50 55 60

ES 2 526 079 T3

Ser 65 Pro Ala Pro Trp 70 Asp Arg Gln Asn Pro Leu 75 Glu Pro Lys Asn Lys 80  
 Ala Arg Phe Ser 85 Ile Pro Ser Met Thr 90 Glu Asp Tyr Ala Gly Arg 95 Tyr  
 Arg Cys Tyr Tyr 100 Arg Ser Pro Val Gly 105 Trp Ser Gln Pro Ser 110 Asp Pro  
 Leu Glu Leu 115 Val Met Thr Gly Ala 120 Tyr Ser Lys Pro Thr 125 Leu Ser Ala  
 Leu Pro 130 Ser Pro Leu Val 135 Thr Ser Gly Lys Ser Val 140 Thr Leu Leu Cys  
 Gln Ser Arg Ser Pro 150 Met Asp Thr Phe Leu Leu 155 Ile Lys Glu Arg Ala 160  
 Ala His Pro Leu 165 Leu His Leu Arg Ser Glu 170 His Gly Ala Gln Gln His 175  
 Gln Ala Glu Phe 180 Pro Met Ser Pro Val 185 Thr Ser Val His Gly 190 Gly Thr  
 Tyr Arg Cys 195 Phe Ser Ser His Gly 200 Phe Ser His Tyr Leu 205 Leu Ser His  
 Pro Ser 210 Asp Pro Leu Glu Leu 215 Ile Val Ser Gly Ser 220 Leu Glu Gly Pro  
 Arg Pro Ser Pro Thr 230 Arg Ser Val Ser Thr Ala 235 Ala Gly Pro Glu Asp 240  
 Gln Pro Leu Met Pro 245 Thr Gly Ser Val Pro 250 His Ser Gly Leu Arg Arg 255  
 His Trp Glu Val 260 Leu Ile Gly Val Leu 265 Val Val Ser Ile Leu Leu Leu 270  
 Ser Leu Leu 275 Leu Phe Leu Leu Leu 280 Gln His Trp Arg Gln 285 Gly Lys His  
 Arg Thr 290 Leu Ala Gln Arg Gln 295 Ala Asp Phe Gln Arg 300 Pro Pro Gly Ala  
 Ala Glu Pro Glu Pro Lys 310 Asp Gly Gly Leu Gln 315 Arg Arg Ser Ser Pro 320  
 Ala Ala Asp Val Gln 325 Gly Glu Asn Phe Cys 330 Ala Ala Val Lys Asn Thr 335

ES 2 526 079 T3

Gln Pro Glu Asp Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Gln Ser Pro His Asp  
 340 345 350

Glu Asp Pro Gln Ala Val Thr Tyr Ala Lys Val Lys His Ser Arg Pro  
 355 360 365

Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu  
 370 375 380

Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu  
 385 390 395 400

Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Arg Leu His  
 405 410 415

Ser Phe Thr Leu Arg Gln Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu  
 420 425 430

Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
 435 440 445

- 5 <210> 30  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 10 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 30  
 ccatagttcc atttacagt tacc 24
- 15 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 20 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 31  
 gggaccaagg gatagacaga 20
- 25 <210> 32  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 30 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 32  
 tccagagttc caggtaagg tcac 24
- 35 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial
- 40 <220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 33  
 gccagtggat agaccgatgg 20  
 5  
 <210> 34  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <220>  
 15 <221> modified\_base  
 <222> (24)..(25)  
 <223> I  
 <220>  
 20 <221> modified\_base  
 <222> (29)..(30)  
 <223> I  
 <220>  
 25 <221> modified\_base  
 <222> (34)..(35)  
 <223> I  
 <400> 34  
 30 ggccacgcgt cgactagtac gggnggggn gggngg 36  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 35  
 40 ggccacgcgt cgactagtac 20  
 <210> 36  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 50 <400> 36  
 ttactgccca tcaatctcc actt 24  
 <210> 37  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Una secuencia de cebador sintetizada de manera artificial  
 <400> 37  
 gatggataca gttggtcag c 21  
 65 <210> 38  
 <211> 408

<212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(408)

10 <220>  
 <221> si\_peptide  
 <222> (1)..(54)

15 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (55)..(408)

<400> 38  
 atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48  
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 -15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 -1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192  
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240  
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro  
 50 55 60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288  
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336  
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 80 85 90

tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384  
 Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

20 <210> 39  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 39

ES 2 526 079 T3

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 -15 -10 -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 -1 1 5 10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro  
 50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 40  
 <211> 381  
 5 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(381)

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(60)

<220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (61)..(381)

20 <400> 40  
 atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
 Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192  
Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
30 35 40

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240  
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
45 50 55 60

cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288  
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75

aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336  
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
80 85 90

agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381  
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
95 100 105

5 <210> 41  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 41  
Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
-20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
-1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
45 50 55 60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
80 85 90

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
95 100 105

10 <210> 42  
<211> 414  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(414)

20 <220>

<221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(57)

5 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (55)..(414)

<400> 42  
 atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 -15 -10 -5

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg 96  
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 -1 1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe  
 15 20 25 30

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192  
 Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
 35 40 45

gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat 240  
 Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn  
 50 55 60

gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
 65 70 75

act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 80 85 90

tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg 384  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
 95 100 105 110

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 414  
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10 <210> 43  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 43  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly  
 -15 -10 -5

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 -1 1 5 10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe  
 15 20 25

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu





ES 2 526 079 T3

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 -1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192  
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45

gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca 240  
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro  
 50 55 60

tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag 288  
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75

ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat 336  
 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 80 85 90

tac tgt gca aga gcc ctc cca tta ccc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 384  
 Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gca 408  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 47  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 47  
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 -15 -10 -5

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 -1 1 5 10

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu  
 35 40 45

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro  
 50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
 80 85 90

ES 2 526 079 T3

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 95 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

5 <210> 48  
 <211> 381  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(381)

15 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(60)

20 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (61)..(381)

<400> 48  
 atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

96  
 ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
 Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

144  
 aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

192  
 gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192  
 Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 30 35 40

240  
 aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 45 50 55 60

288  
 cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75

336  
 aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336  
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 80 85 90

381  
 agc tat cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381  
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

25 <210> 49  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 49

ES 2 526 079 T3

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 30 35 40

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 45 50 55 60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 80 85 90

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 95 100 105

5 <210> 50  
 <211> 1401  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada de manera artificial

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1398)

15 <220>  
 <221> si\_peptide  
 <222> (1)..(54)

20 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (55)..(1398)

<400> 50  
 atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48  
 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile  
 -15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96  
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 -1 1 5 10

tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc 144  
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 15 20 25 30

agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 192  
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

ES 2 526 079 T3

			35			40						45				
gag	tgg	atg	ggc	tac	ata	agc	tac	agt	ggt	agc	act	agc	tac	aac	cca	240
Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	
			50					55					60			
tct	ctc	aaa	agt	cga	atc	tct	atc	act	cga	gac	aca	tcc	aag	aac	cag	288
Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
		65					70					75				
ttc	ttc	ctg	cag	ttg	aat	tct	gtg	act	act	gag	gac	aca	gcc	aca	tat	336
Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	
	80					85				90						
tac	tgt	gca	aga	tct	ccc	cct	tac	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggt	caa	384
Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
95					100					105					110	
gga	acc	tca	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	432
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
				115					120					125		
ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	480
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
			130					135					140			
ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	528
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
		145					150					155				
tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	576
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
	160					165					170					
cta	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	624
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
175					180				185						190	
tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	672
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				195				200					205			
ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	ggt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	720
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
			210					215					220			
aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	768
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
		225					230					235				
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	816
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	240					245					250					
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	864
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
255				260				265							270	
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	912
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				275				280					285			
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	960
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			290				295						300			
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	1008
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	

ES 2 526 079 T3

	305	310	315	
	gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			1056
	320	325	330	
	aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			1104
	335	340	345	
	acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			1152
	355	360	365	
	acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			1200
	370	375	380	
	gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			1248
	385	390	395	
	ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			1296
	400	405	410	
	aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			1344
	415	420	425	
	gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			1392
	435	440	445	
	ggt aaa tga Gly Lys			1401
5	<210> 51 <211> 466 <212> PRT <213> Artificial			
10	<220> <223> Constructo sintético			
	<400> 51 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile -15 -10 -5			
	Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro -1 1 5 10			
	Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr 15 20 25 30			
	Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu 35 40 45			
	Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro 50 55 60			

ES 2 526 079 T3

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
65 70 75

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr  
80 85 90

Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
95 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
160 165 170

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
175 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
240 245 250

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
255 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
320 325 330

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 335 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 400 405 410  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 415 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys

<210> 52  
 <211> 705  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada de manera artificial  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(702)  
 15 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(60)  
 20 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (61)..(702)  
 <400> 52  
 atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5  
 ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96  
 Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10  
 aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25  
 gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192

ES 2 526 079 T3

Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	
	30					35					40					
aaa	cta	ctg	att	tac	tgg	gca	tcc	acc	cgg	cac	act	gga	gtc	cct	gat	240
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	60
45					50					55						
cgc	ttc	aca	ggc	agt	gga	tct	ggg	aca	gat	ttc	act	ctc	acc	att	agc	288
Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	75
				65					70							
aat	gtg	cag	tct	gaa	gac	ttg	gca	gat	tat	ttc	tgt	cag	caa	tat	agc	336
Asn	Val	Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	90
			80					85								
agc	tat	cct	ctc	acg	ttc	ggg	gct	ggg	acc	aag	ctg	gag	ctg	aaa	cga	384
Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	105
		95				100						105				
act	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	cag	432
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	110
	110					115					120					
ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	tat	480
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	125
					130					135					140	
ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	tcg	528
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	145
				145					150					155		
ggt	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	acc	576
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	160
			160					165					170			
tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	gca	gac	tac	gag	aaa	624
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	175
		175				180						185				
cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	ggc	ctg	agc	tcg	ccc	672
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	190
	190					195					200					
gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	tgc	tag						705
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							205
					210											

5 <210> 53  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Constructo sintético

<400> 53  
 Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 -20 -15 -10 -5

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser  
 -1 1 5 10

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
 15 20 25

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 30 35 40  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 45 50 55 60  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75  
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser  
 80 85 90  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 95 100 105  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 110 115 120  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 125 130 135 140  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 160 165 170  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 175 180 185  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 190 195 200  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 205 210

<210> 54  
 <211> 1407  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada de manera artificial

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1404)

15 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(57)

20 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (55)..(1404)



ES 2 526 079 T3

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 816  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 240 245 250  
 atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc 864  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser  
 255 260 265  
 cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 912  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 275 280 285  
 gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg 960  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300  
 tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat 1008  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Thr Val His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315  
 ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc 1056  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 320 325 330  
 atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag 1104  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 335 340 345 350  
 gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc 1152  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg 1200  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct 1248  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395  
 ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc 1296  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 400 405 410  
 gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg 1344  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 415 420 425 430  
 atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1392  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 tct ccg ggt aaa tga 1407  
 Ser Pro Gly Lys

<210> 55  
 <211> 468  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Constructo sintético

10

<400> 55  
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly





<222> (61)..(702)

<400> 56

atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca	48
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser	
-20 -15 -10 -5	
gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct	96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	
-1 1 5 10	
gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt	144
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	
15 20 25	
att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca	192
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro	
30 35 40	
agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc	240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser	
45 50 55 60	
agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn	
65 70 75	
agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac	336
Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn	
80 85 90	
agc tgg ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa cga	384
Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg	
95 100 105	
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag	432
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
110 115 120	
ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat	480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
125 130 135 140	
ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg	528
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	
145 150 155	
ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc	576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	
160 165 170	
tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa	624
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys	
175 180 185	
cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc	672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro	
190 195 200	
gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc tag	705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
205 210	

5

<210> 57

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 57

Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser  
 -20 -15 -10 -5

Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser  
 -1 1 5 10

Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 15 20 25

Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro  
 30 35 40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser  
 45 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn  
 65 70 75

Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn  
 80 85 90

Ser Trp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 95 100 105

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 110 115 120

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 125 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 145 150 155

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 160 165 170

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 175 180 185

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 190 195 200

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 205 210

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*



Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

5 <210> 63  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR

<400> 63

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

15 <210> 64  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(5)  
 <223> CDR

<400> 64

Ser Tyr Trp Ile His  
 1 5

30 <210> 65  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDR

<400> 65

Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

40 gly

45 <210> 66  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(10)  
 <223> CDR

<400> 66

Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

55 <210> 67  
 <211> 11  
 <212> PRT

<213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (1)..(11)  
 <223> CDR  
 <400> 67  
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His  
 1 5 10  
 <210> 68  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDR  
 20 <400> 68  
 Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5  
 <210> 69  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR  
 <400> 69  
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr  
 35 1 5  
 <210> 70  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 40 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(6)  
 <223> CDR  
 45 <400> 70  
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
 1 5  
 <210> 71  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(17)  
 <223> CDR  
 60 <400> 71

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

Arg

5 <210> 72  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR  
 <400> 72

Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr  
 1 5

15 <210> 73  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDR  
 25 <400> 73

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1 5 10

30 <210> 74  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDR  
 <400> 74

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

40 <210> 75  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR  
 <400> 75

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

55 <210> 76  
 <211> 4  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada de manera artificial

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de manera natural

10

<400> 76

Tyr Xaa Xaa Leu  
1

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano, y suprime la producción de interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) desde células que expresan ILT7, o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno.
2. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que la célula que expresa ILT-7 es una célula productora de interferón (IPC).
- 10 3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2, en el que la célula es positiva para CD123 o positiva para BDCA-2.
- 15 4. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula es negativa para CD3, negativa para CD14, negativa para CD16, negativa para CD19, negativa para CD20 y negativa para CD56.
- 20 5. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo monoclonal se produce mediante un método que comprende las siguientes etapas de:
  - (1) administrar a un animal no humano una célula que conserva los siguientes puntos (a) y (b) de manera expresable:
    - 25 (a) un polinucleótido exógeno que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio extracelular de ILT7 humano; y
    - (b) un polinucleótido exógeno que codifica para la cadena  $\gamma$  del receptor de Fc (FcR $\gamma$ );
  - 30 (2) producir y seleccionar una célula productora de anticuerpos que produce un anticuerpo que se une a ILT7 humano desde la célula productora de anticuerpos del animal no humano; y
  - (3) cultivar la célula así seleccionada y recuperar un anticuerpo monoclonal del cultivo.
- 35 6. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 5, en el que la célula es una célula animal; y opcionalmente en el que la célula es una célula derivada de ser humano; y además opcionalmente en la que la célula derivada de ser humano es una célula 293T.
7. Anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fragmento que comprende su región de unión a antígeno es Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv de cadena sencilla o diacuerpo.
- 40 8. Método para detectar una célula productora de interferón, que comprende las etapas de:
  - poner en contacto el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con una célula de prueba; y
  - 45 detectar el anticuerpo monoclonal o el fragmento que comprende su región de unión a antígeno que se une a la célula.
9. Agente de supresión de interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) que comprende el anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como componente activo.

1 2 3 4 5 6 7



- 1. Monocito
- 2. IPC
- 3. IPC + VHS
- 4. Célula B (positiva para CD19)
- 5. Célula T (positiva para CD3)
- 6. Célula T activada
- 7. Linfocito citolítico (positivo para CD56)

FIG. 1a

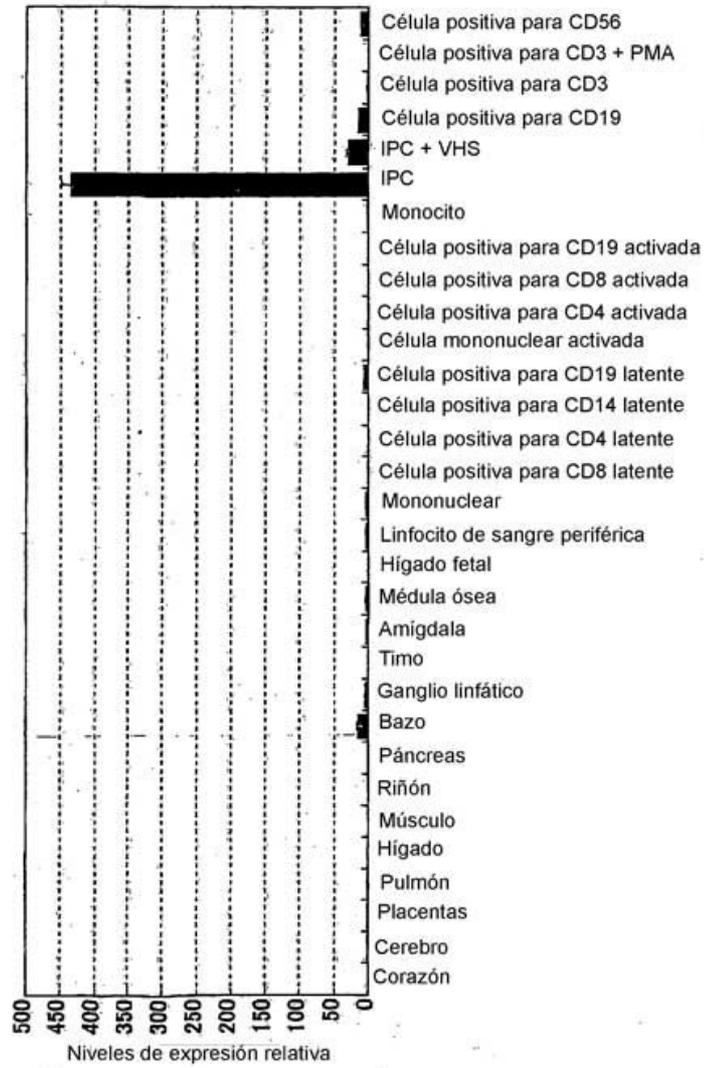


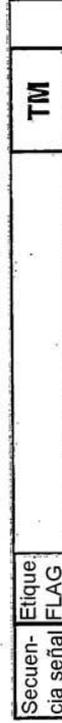
FIG. 1b

(a) Secuencia señal

MTLILTSLLFFGLSLQPRTRVQAENL PKPILWAEPGPVITWHPVTIWCQGTLEAQGYRL  
 DKEGNSMRHILKTLESENKVKLSIPSMMEHAGRYHCYYQSPAGWSEPSDPLELVWTAY  
 SRPTLSALPSPVVTSGVNVTLRCASRLGLGRFTLIEEGDHLRSLWTLNSHQHNHGKFKALF  
 PMGPLTFSNRGTRFCYGYENNTPYWSESDPLQLLVSGVSRKPSLLTLQGPVVTGGENL  
 TLQCGSDVGYIRYTLYKEGADGLPQRPGRQAGLSQANFTLSPVSRSYGGQYRCYGAHN  
 VSSEWSAPSDPLDILIAQGISDRPSLSVQGPVTSGEKVTLQGSWDPMFTLLTKEGA  
 AHPPLRLRSMYGAHKYQAEFPMPVTSAHAGTYRCYGRSSNPYLLSHPSEPLELVSGA  
 TETLNPAAKKSCKTAPHLQDYTVENLIRMGVAGLVLLFLGLLEAQHSQRSPPRCSQE  
 ANSRKDNAPFRVVEPWEQI (SEQ ID NO:2) Región transmembrana (TM)

(b)

**N-FLAG ILT7(57KDa)**



**C-FLAG ILT7(57KDa)**



FIG. 2

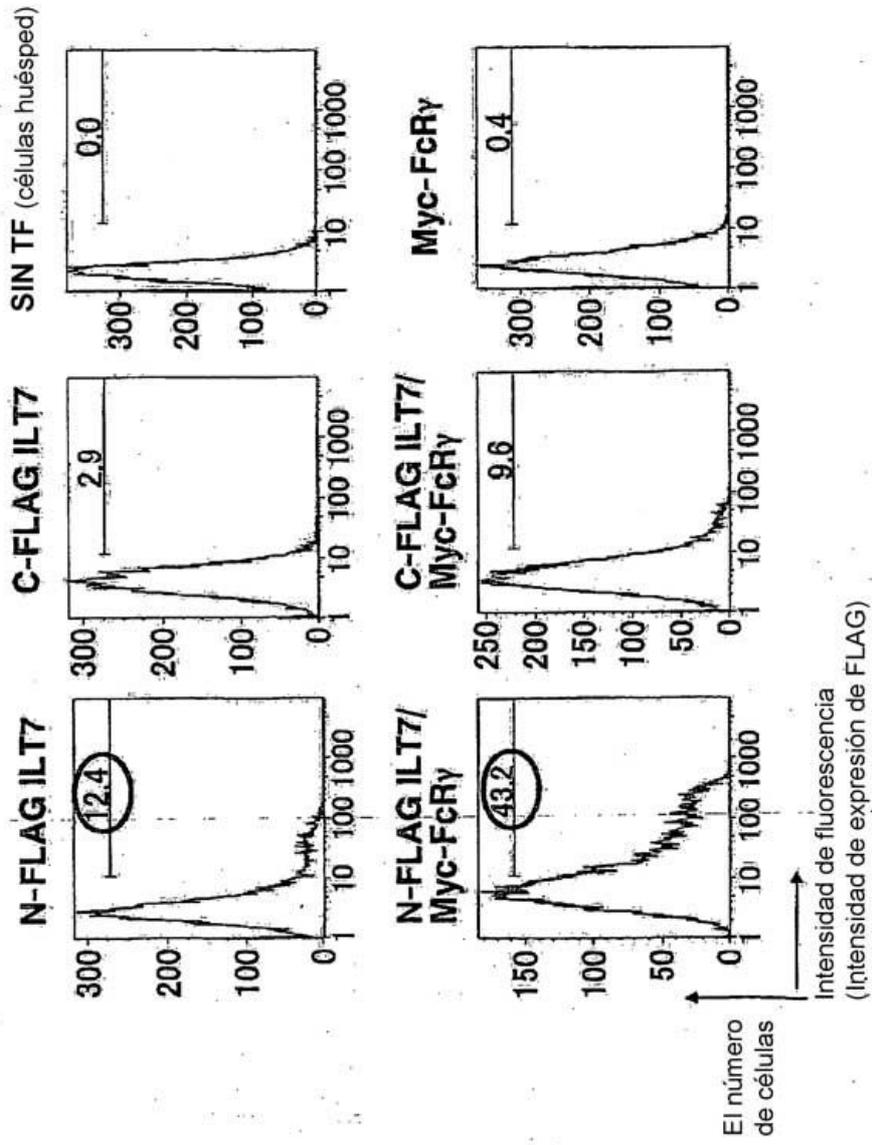


FIG. 3

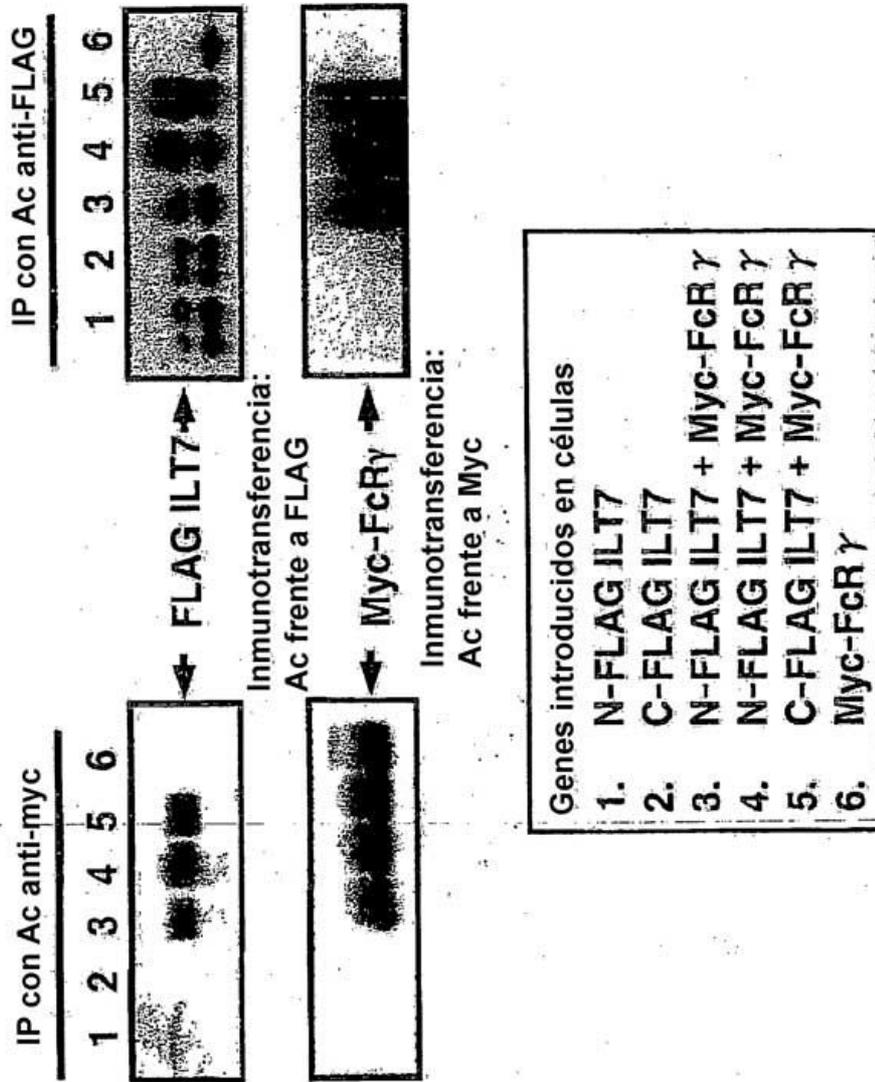


FIG. 4

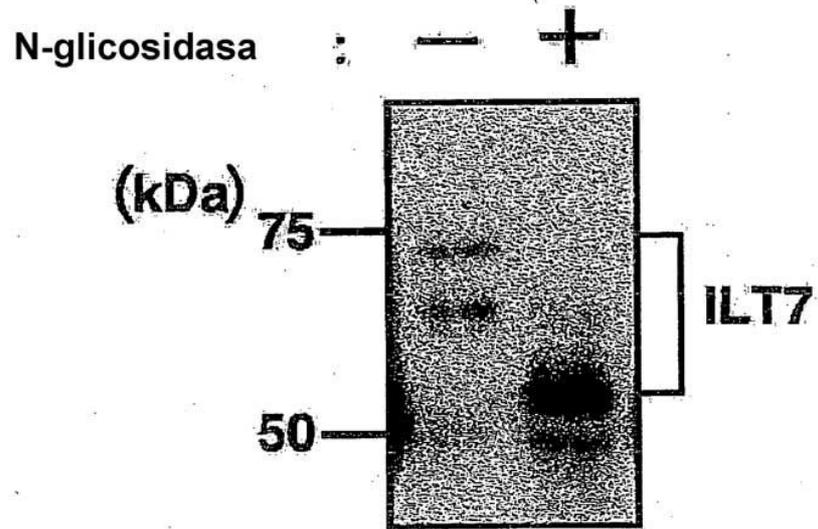


FIG. 5

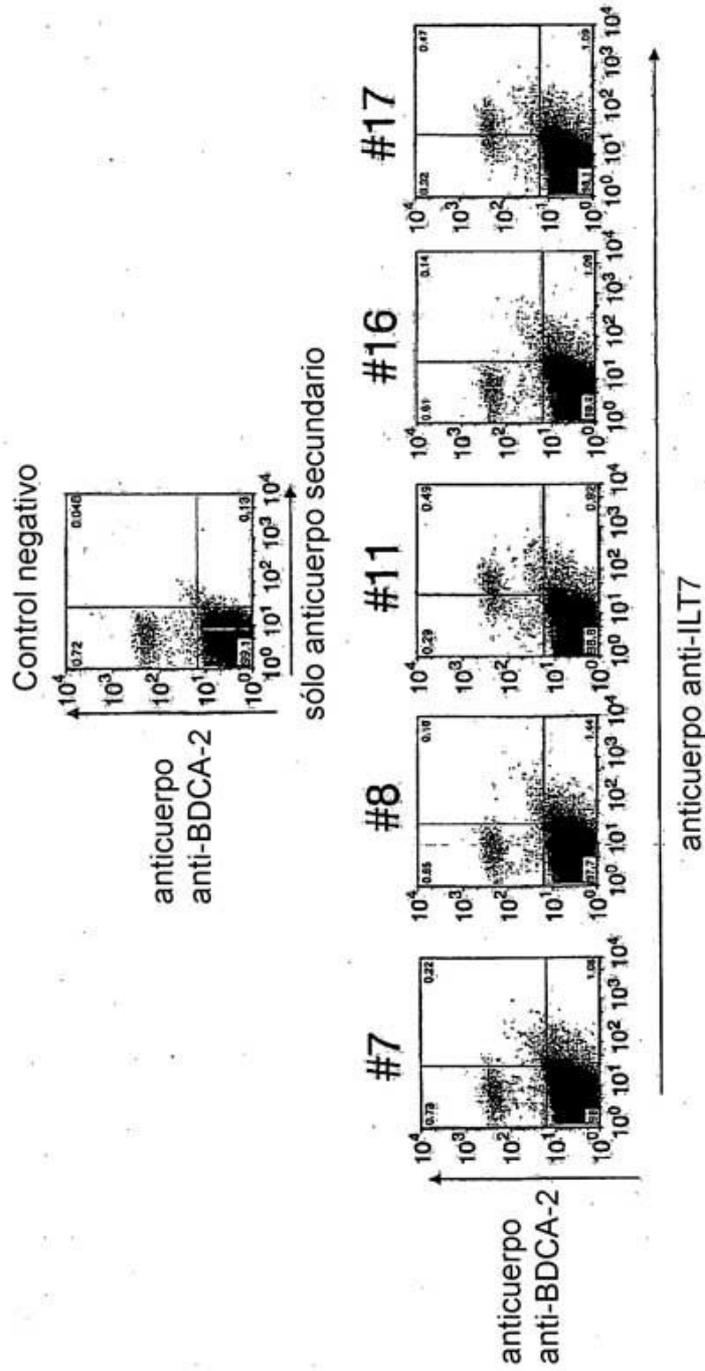


FIG. 6a

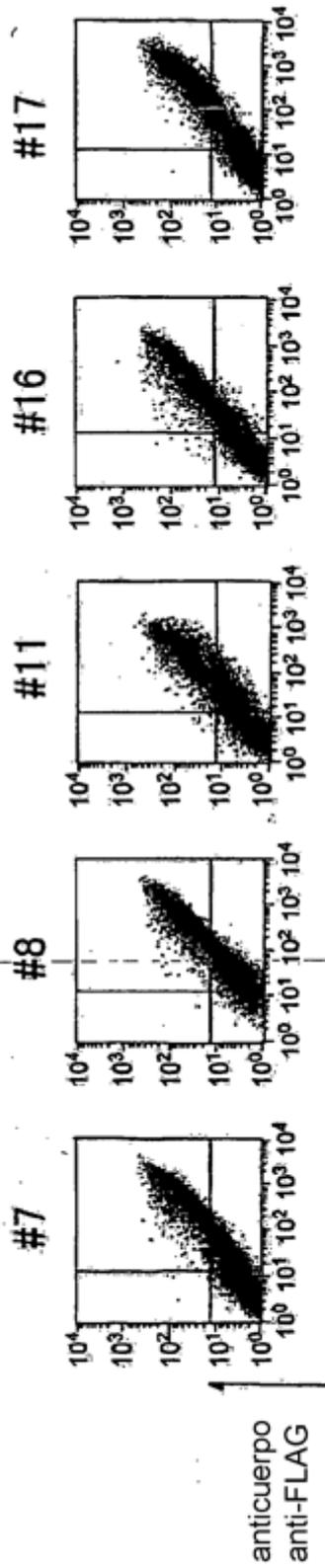


FIG. 6b

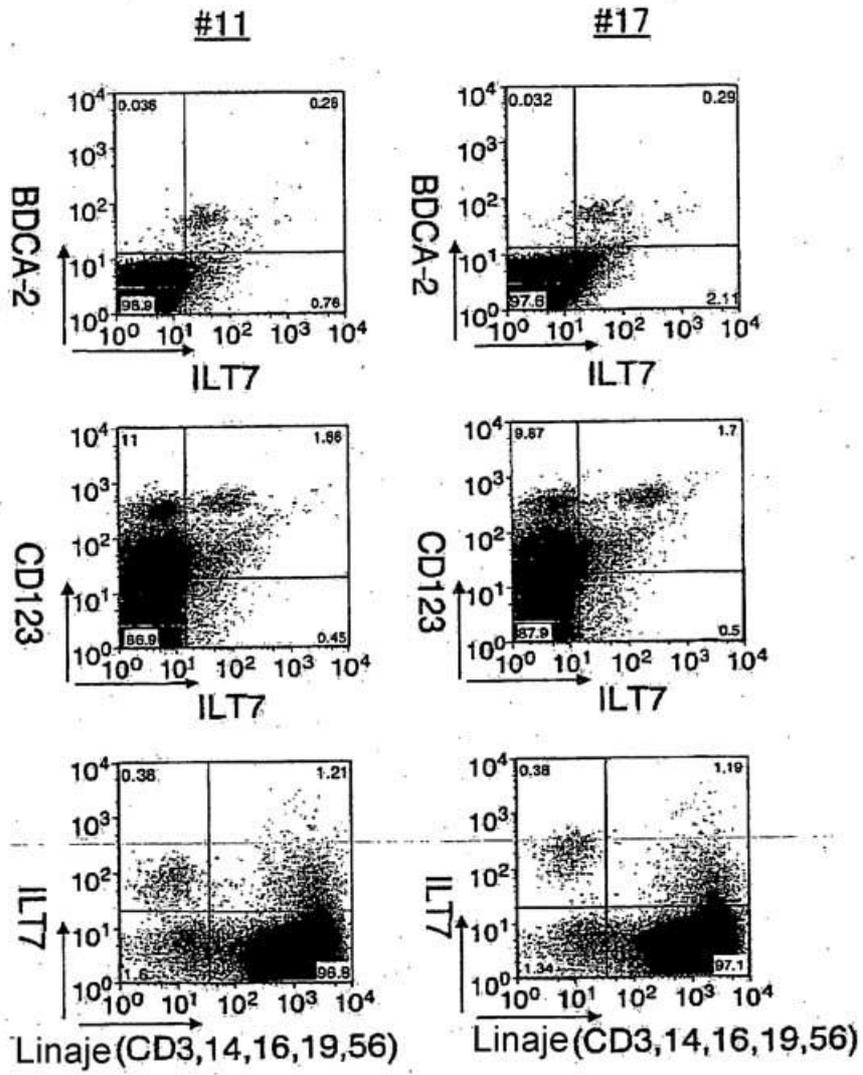


FIG. 7

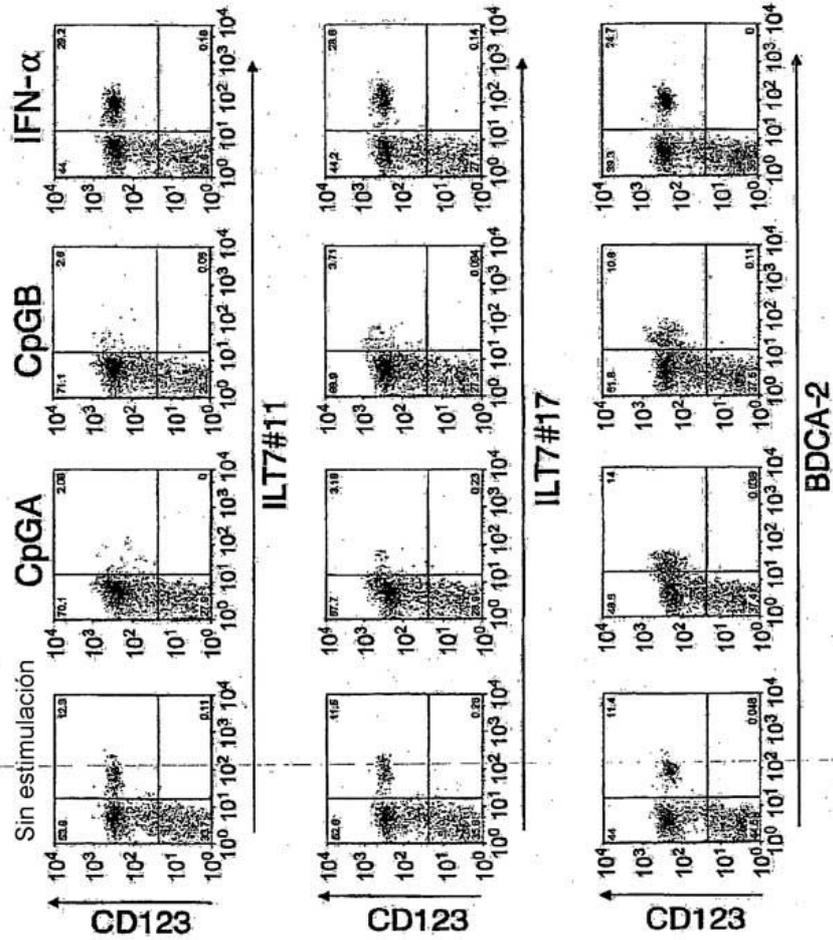


FIG. 8

IL7	1	MT	IL	LL	SL	LL	EE	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TR	VQ	AA	EN	LL	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60
IL7	1	MT	PA	LL	LL	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TR	RV	AA	GG	PP	FP	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60
LIR6	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	RL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL71	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	RL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL76	1	MT	SI	LL	VL	LI	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL72	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL74	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
LIR8	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL73	1	MT	PI	LV	VL	LI	CL	GL	SL	GL	SL	GL	PR	TH	VQ	AA	GG	PP	KL	PL	WA	EP	GS	VI	IS	WQ	SS	VT	IW	CO	GS	LE	AO	GE	YR	LL	60	
IL77	61	KE	CN	MS	RR	HL	IK	TL	EL	SE	NK	VK	IL	SE	NK	VK	IL	118																				
IL75	61	DK	EG	SS	PE	PP	WW	DR	NN	PL	EL	SE	NK	VK	IL	119																						
IL78	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	119																		
LIR6	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	118																		
IL71	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	118																		
IL76	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	118																		
IL72	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	118																		
IL74	61	YR	KK	KT	AA	SW	IR	RI	IO	EP	PK	KN	KA	PP	IL	SE	NK	VK	IL	118																		
LIR8	61	DK	EG	SS	PE	PP	WW	DR	NN	PL	EL	SE	NK	VK	IL	119																						
IL73	61	DK	EG	SS	PE	PP	WW	DR	NN	PL	EL	SE	NK	VK	IL	119																						
IL77	179	AY	SR	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	178		
IL75	120	EY	NK	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	179	
IL78	120	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	179		
LIR6	121	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	180		
IL71	179	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	179		
IL76	121	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	180		
IL72	121	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	180		
IL74	120	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	179		
LIR8	120	EY	NK	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	178	
IL73	120	AY	SK	PT	LS	AL	PS	PV	VT	SG	VN	VT	LR	CA	SS	RL	GL	GR	PL	IL	EG	CD	HR	LS	WT	LN	SS	HT	LD	NS	HO	HN	HG	CK	FO	178		

FIG. 9a



IL7 358	EGAAHP	PLRLRS	MYGAHK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSEP	LELVV	417	
IL7 359	EGAAHP	PLRLRS	MYGAHK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSEP	LELMV	418	
IL7 359	EGAAHP	PLRLRS	MYGAHK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSEP	LELMV	418	
LIR6 360	AGAAAD	PLRLRS	IHEYPK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELMV	419	
IL7 358	EGAGHP	PLHLRS	EHQAQQ	KYQAEFP	RMGPF	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELVV	417	
IL7 360	EGAADSP	PLRLRS	KRQSHK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELVV	419	
IL7 360	EGAADDF	WRRLRS	TYOSQK	KYQAEFP	PMGPF	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELVV	419	
IL7 359	AGAADAP	PLRLRS	IHEYPK	KYQAEFP	PMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELVV	418	
LIR8 358	EGAAHP	PLCLRS	KYOSYR	HQAEF	SMSPV	TSAHAG	TYRCY	GRSSNP	YLLS	HPSPD	LELVV	417	
IL7 335	NTQPED	GVEMDT	RQSPHD	-----	EDPQ	AVTYAK	VKHSR	PRRREMA	SPSP	-P	LSGEP	383	
región transmembrana													
IL7 418	BGATEL	NPAQ	KKSDSK	-----	TAPHL	ODY	TVEN	LIRMG	VAGL	VLL	FLGIL	463	
IL7 419	BCHSGS	PLP	TPGP	-----	TPCLG	RYLE	EVLI	IGVSV	VAGL	VLL	FLLEL	461	
IL7 419	BCHSGS	PLP	TPGP	-----	TPCLG	RYLE	EVLI	IGVSV	VAGL	VLL	FLLEL	461	
LIR6 420	SGAAET	LSPP	QNKSDSK	-----	AASHAK	DY	TVEN	LIRMG	VAGL	VLL	FLGIL	447	
IL7 418	BSLGH	PLP	TPGP	-----	AANT	LSPS	QNK	TASH	PDY	TVEN	LIRMG	448	
IL7 418	BSLGH	PLP	TPGP	-----	AANT	LSPS	QNK	TASH	PDY	TVEN	LIRMG	448	
IL7 420	SGAAET	LSPP	QNKSDSK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	449	
IL7 420	SGAAET	LSPP	QNKSDSK	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	449	
IL7 420	SGSGG	PPSPT	TCPTST	-----	PED	PLT	PTG	SDP	QSG	LGR	HLG	VVI	478
IL7 419	SGPSM	GSB	PTCPTST	-----	PED	PLT	PTG	SDP	QSG	LGR	HLG	VVI	478
LIR8 418	SGSGDP	PLS	PTGPT	-----	PED	PLT	PTG	SDP	QSG	LGR	HLG	VVI	476
IL7 384	LDTKDR	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	476	

FIG. 9c

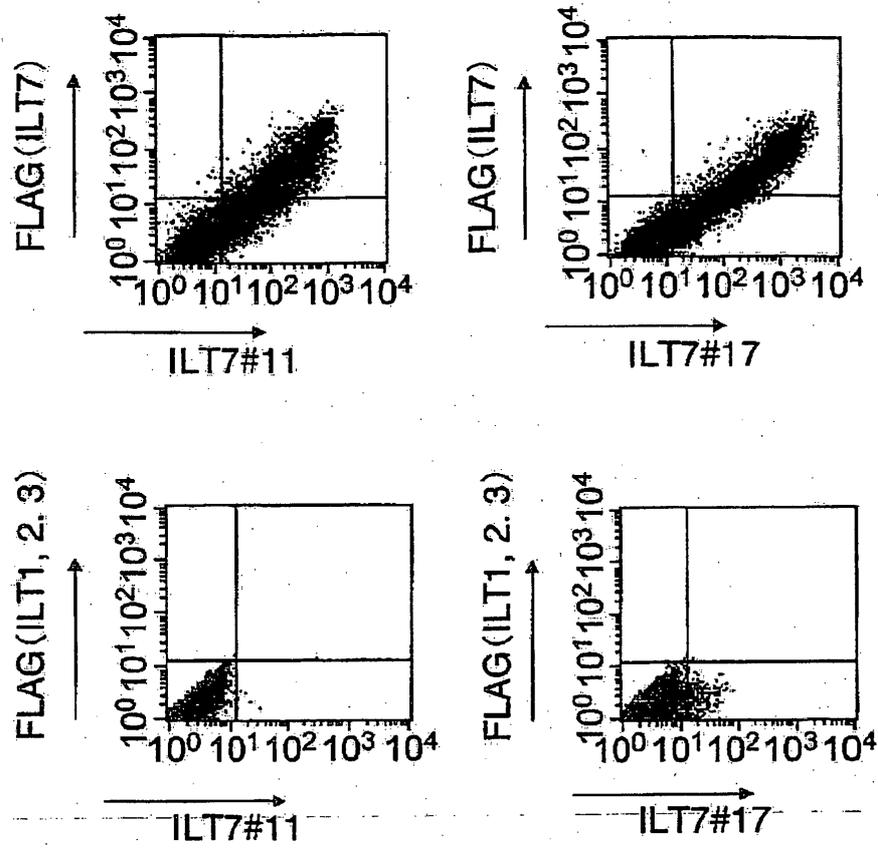


FIG. 10

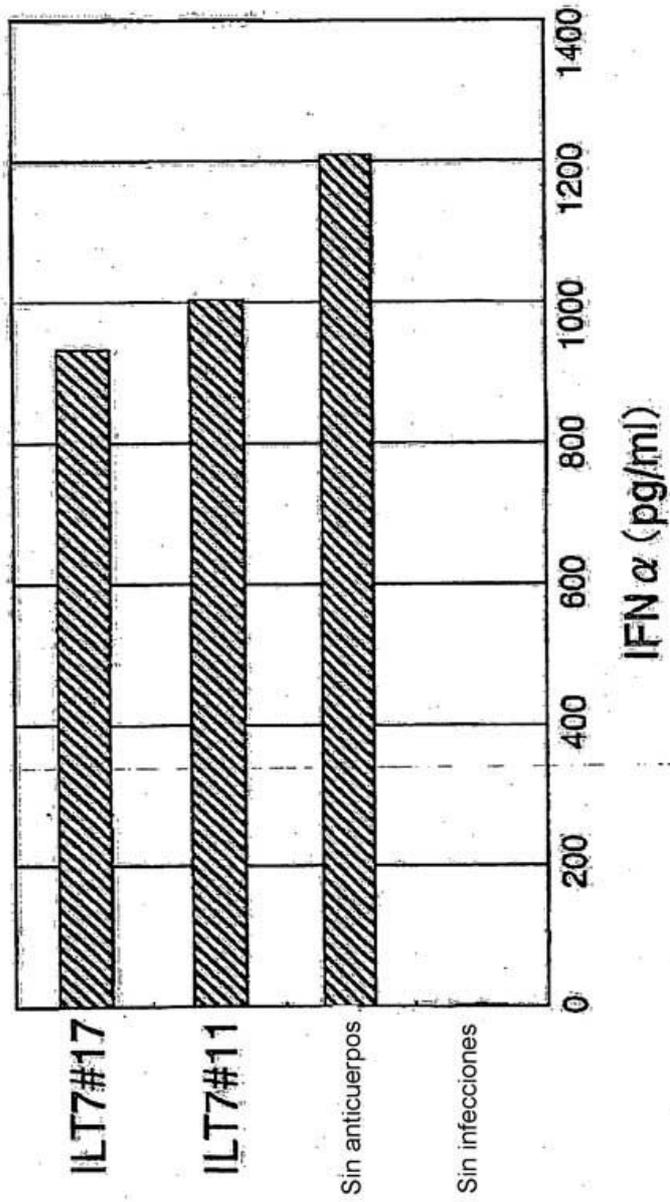


FIG. 11

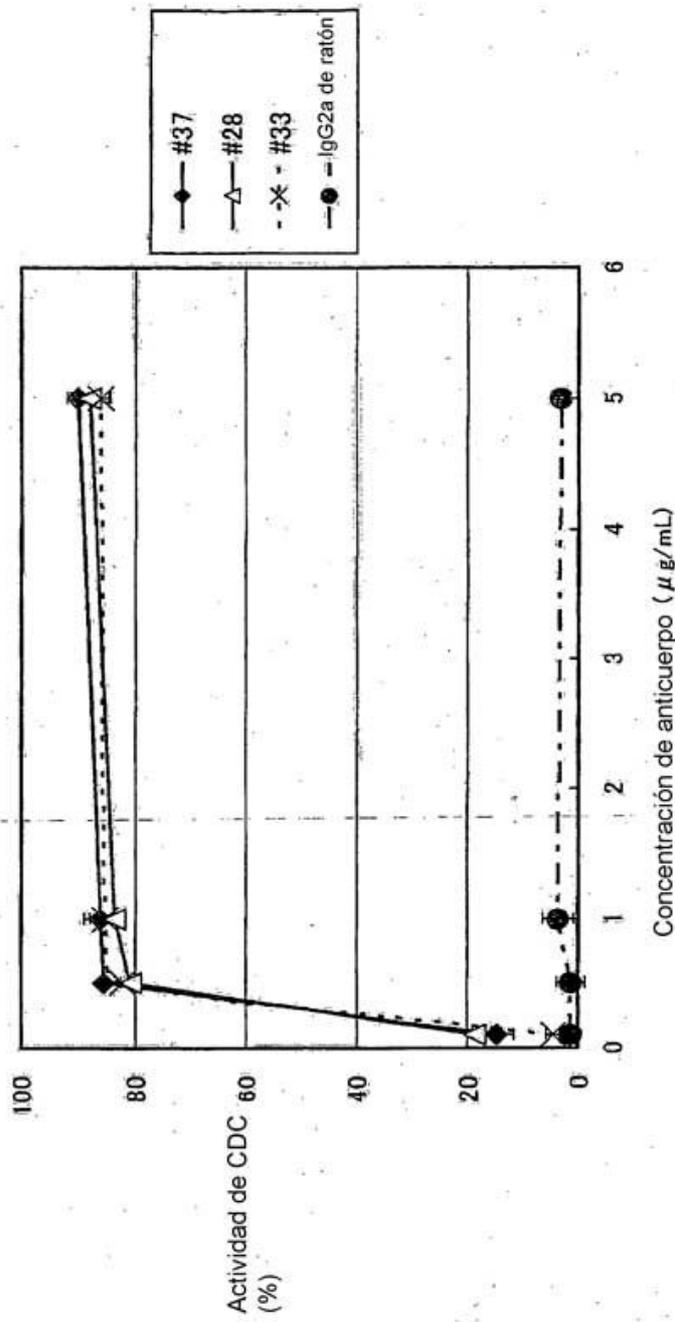


FIG. 12

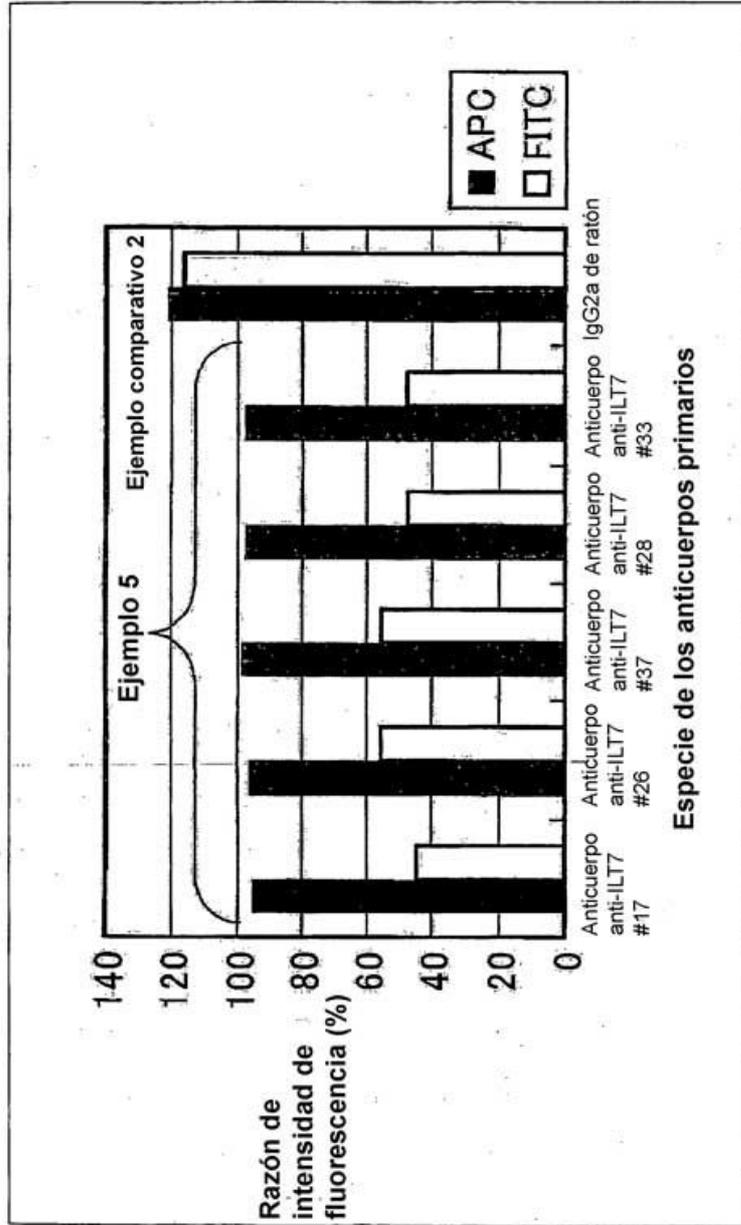


FIG. 13