

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 814**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11715365 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2556086**

54 Título: **Proteínas, ácidos nucleicos, y anticuerpos BTNL9 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.04.2010 US 322800 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2015

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**ARNETT, HEATHER A.;
ESCOBAR, SABINE S.;
SWANSON, RYAN M. y
VINEY, JOANNE L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 537 814 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

Proteínas, ácidos nucleicos, y anticuerpos BTLN9 y usos de los mismos

Campo

La invención se refiere a una proteína tipo butirofilina y usos de la misma.

5 Antecedentes

La modulación de una respuesta inmunitaria o inflamatoria puede ser valiosa en varios cuadros terapéuticos. La modulación negativa de una respuesta inmunitaria o inflamatoria puede ser deseable en el tratamiento de varios tipos de enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias.

10 La modulación positiva de cualquier respuesta inmunitaria puede ser valiosa para, por ejemplo, amplificar una respuesta a un antígeno en particular, por ejemplo, un antígeno que está contenido en una vacuna o un antígeno que se expresa preferentemente en una célula cancerosa o una célula que interviene en una enfermedad fibrótica. Por lo tanto, las moléculas que son capaces de modular una respuesta inmunitaria o inflamatoria tienen un valor terapéutico potencial en una variedad de cuadros terapéuticos. Una de tales moléculas que pueden tener un valor terapéutico es la proteína 9 tipo butirofilina (BTLN9).

15 El documento WO 2004/022594 desvela, entre otras proteínas, una proteína BTLN9 aislada monomérica soluble. También se desvelan las proteínas de fusión con BTLN9. La proteína BTLN9 del documento WO 2004/022594 comprende una secuencia de aminoácidos (hsB7-H4LV) que se corresponde con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 de la presente invención. Los autores del documento WO 2004/022594 especulan sobre que la BTLN9 puede modular una respuesta inmunitaria, bien por estimulación o bien por inhibición, pero no se proporcionan datos funcionales a este respecto.

20 La presente invención proporciona una proteína BTLN9 multimérica soluble y usos de la misma para tratar enfermedades que se caracterizan por inflamación y/o respuestas inmunitarias inapropiadas y/o anormales. Este agente puede inhibir la inflamación y/o las respuestas inmunitarias.

Sumario

25 La invención proporciona proteínas BTLN9 solubles multiméricas y los usos médicos de las mismas. También se describen en el presente documento los usos de anticuerpos agonistas y antagonistas que se unen a la BTLN9.

30 En una realización, la invención engloba una proteína BTLN9 aislada multimérica soluble que comprende (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, y (b) un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, en que la ventana de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de (a) y (b) con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 1 es al menos de 80 aminoácidos de longitud, en la que el multímero es al menos un tetrámero, y en que la proteína BTLN9 multimérica puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. En una realización ligeramente diferente, la invención proporciona una proteína BTLN9 multimérica soluble que comprende

35 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, y (b) un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, en que la ventana de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos (a) y (b) con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 es al menos de 80 aminoácidos de longitud, en que el multímero tiene un peso molecular que es mayor de aproximadamente cuatro veces el de un polipéptido monomérico de (a) y/o al menos aproximadamente cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis veces mayor que el de un polipéptido monomérico de (a), y en que la proteína BTLN9 multimérica puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. La proteína BTLN9 multimérica en cualquiera de estas realizaciones también puede ser al menos un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero, un nonámero, un decámero, y/o un multímero de mayor orden, lo que también significa que la proteína BTLN9 multimérica puede ser un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero, un nonámero, un decámero, y/o un multímero de mayor orden. La proteína BTLN9 multimérica puede comprender la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 35, 36, 37, 38, 39, o 40 a 253, 254, 255, 256, o 257 de la SEC ID N° 2. En algunas realizaciones, la proteína BTLN9 multimérica no comprende los aminoácidos 258 a 277 de la SEC ID N° 2, y en algunas realizaciones puede comprender otro polipéptido, tal como, por ejemplo, una parte Fc de un anticuerpo. Tal parte Fc de anticuerpo puede comprender (i) la secuencia de aminoácidos de la región Fc nativa humana o (ii) una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la de la región Fc nativa humana que tiene no más de 15, no más de 10, o no más de 5 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de la región Fc nativa humana. El Fc nativo humano puede ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgM, o IgE. La proteína BTLN9 multimérica puede ser un homotetrámero, un homopentámero, un homohexámero, un

homoheptámero, un homooctámero, un homononámero, un homodecámero, un homomultímero de grado más alto, un heteromultímero, o una mezcla de especies. También se proporciona el uso de ácidos nucleicos que codifican BTNL9 para la producción de la proteína BTNL9 multimérica, así como el uso de vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y el uso de células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos para la producción de la proteína BTNL9 multimérica de la invención.

También se describe en el presente documento una proteína de fusión BTNL9 que comprende (a) un primer polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 en que la ventana de alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión BTNL9 con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 tiene al menos 80 aminoácidos de longitud, y (b) un segundo polipéptido, con el que la proteína de fusión BTNL9 puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. La proteína de fusión puede ser una proteína aislada y/o soluble. El segundo polipéptido puede ser una parte Fc de un anticuerpo, en el que la parte Fc tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente similar a una secuencia de aminoácidos de la región Fc nativa humana y no contiene más de 5, 10, 15 o 20 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la región Fc nativa humana. La región Fc nativa humana puede ser un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, o IgM. La proteína de fusión BTNL9 puede comprender los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2. La proteína de fusión BTNL9 puede comprender una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la SEC ID N° 18, en la que la secuencia de aminoácidos no comprende más de 5, 10, 15, o 20 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la SEC ID N° 18, y/o la proteína de fusión BTNL9 puede comprender la SEC ID N° 18. La proteína de fusión puede ser al menos un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero, un nonámero, o un decámero. La proteína de fusión BTNL9 puede comprender un engarce. Tal proteína de fusión BTNL9 puede ser un multímero, en la que el multímero tiene un peso molecular de al menos aproximadamente cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, o dieciséis veces mayor que la proteína de fusión BTNL9 monomérica. También se describen los ácidos nucleicos que codifican tal proteína de fusión BTNL9, así como los vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y las células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos.

También se describe en el presente documento una proteína BTNL9 soluble que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la SEC ID N° 2 que se extiende desde la posición 40-140 de la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que no comprende más de 5 o 10 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N° 2, en que la proteína BTNL9 no comprende además la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la SEC ID N° 2 que se extiende de la posición 160 a 248 de la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que no comprende más de 20, 15, 10, 10, o 5 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a los aminoácidos 160-248 de la SEC ID N° 2, y en que la proteína BTNL9 puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. La proteína BTNL9 soluble puede no comprender más de 5 inserciones, deleciones o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N° 2. O, en otro aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteína BTNL9 soluble puede ser idéntica en al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% a los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N° 2. La proteína BTNL9 soluble puede ser al menos un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero, un nonámero, un decámero, y/o un multímero de mayor orden, o una mezcla de estas especies. Tal proteína BTNL9 soluble puede ser un multímero, en que el multímero tiene un peso molecular de al menos aproximadamente cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, o dieciséis veces mayor que la proteína BTNL9 monomérica soluble. Tal proteína BTNL9 soluble puede además comprender otro polipéptido, tal como, por ejemplo, un fragmento Fc de un anticuerpo y/o un engarce. También se describen los ácidos nucleicos que codifican tal proteína BTNL9 soluble, así como los vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y las células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos.

De manera alternativa, una proteína BTNL9 soluble como la que se describe en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la SEC ID N° 2 que se extiende desde la posición 160 a 248 de la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que no comprende más de 20, 15, 10, o 5 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a los aminoácidos 160-248 de la SEC ID N° 2, en que la proteína BTNL9 no comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento de la SEC ID N° 2 que se extiende desde la posición 40-140 de la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que no comprende más de 10 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a los aminoácidos 40-140 de la SEC ID N° 2, y en que la proteína BTNL9 puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. Tal proteína BTNL9 soluble puede ser al menos un trímero, un tetrámero, un pentámero, un hexámero, un heptámero, un octámero, un nonámero, un decámero, y/o un multímero de mayor orden. Tal proteína BTNL9 soluble puede comprender además otro polipéptido, tal como, por ejemplo, un fragmento Fc de un anticuerpo y/o un engarce. Tal proteína BTNL9 soluble puede ser un multímero, en que el multímero tiene un peso molecular de al menos aproximadamente cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis veces mayor que la proteína BTNL9 soluble monomérica. También se describen los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de fusión BTNL9, así como los vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y las células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos.

Además se describe en el presente documento una proteína de fusión BTNL9 codificada por un ácido nucleico, en que el ácido nucleico comprende lo siguiente: (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, (i) que consiste en la secuencia de nucleótidos desde los nucleótidos 334, 337, 340, o 343 a 990, 993, 996, 999, o 1002 de la SEC ID N° 1 o (ii) que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el polinucleótido de (i); y (b) un polinucleótido que no se hibrida con un polinucleótido que consiste en la SEC ID N° 1 y codifica un polipéptido en fase con el polipéptido codificado por el nucleótido de (a); en que la proteína de fusión puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. La proteína de fusión BTNL9 puede comprender una secuencia de engarce y puede ser una proteína aislada y/o soluble. Tal proteína de fusión BTNL9 puede ser un multímero, en la que el multímero tiene un peso molecular de al menos aproximadamente cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis veces mayor que la proteína de fusión BTNL9 monomérica. También se describen en el presente documento los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas de fusión BTNL9, así como los vectores que comprenden estos ácidos nucleicos y las células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos.

Cualquiera de las proteínas BTNL9 que se tratan anterior o posteriormente pueden estar aisladas y/o ser solubles y pueden comprender multímeros o especies agregadas, que comprenden múltiples moléculas de una proteína BTNL9. El peso molecular de especies monoméricas de proteína BTNL9 que están contenidas en el multímero o agregado se puede medir por electroforesis en gel bajo condiciones de reducción o por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) realizada bajo condiciones de reducción. El peso molecular de las especies multiméricas o agregadas se puede medir por electroforesis en gel o SEC realizadas bajo condiciones de no reducción. En algunas realizaciones el multímero o agregado tiene un peso molecular que es al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 veces el de las especies monoméricas. La proteína BTNL9 monomérica de tal multímero o agregado comprende (a) un polipéptido que comprende la secuencia desde el aminoácido 35, 36, 37, 38, 39, o 40 al 253, 254, 255, 256 o 257 de la SEC ID N° 2 o (b) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90%, 95%, 97% o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 en que la ventana de alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de (b) con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 es al menos de 80 aminoácidos de longitud o (c) un polipéptido que tiene una secuencia similar a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 excepto en que puede contener no más de 20, 15, 10 o 5 inserciones, delecciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la SEC ID N° 2.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína BTNL9 y otro polipéptido, en que el ácido nucleico comprende (a) un polinucleótido (i) que consiste en la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 334, 337, 340, o 343 al 990, 993, 996, 999 o 1002 de la SEC ID N° 1 o (ii) que se hibrida bajo condiciones rigurosas al polinucleótido de (i); y (b) un polinucleótido que no se hibrida con un polinucleótido que consiste en la secuencia SEC ID N° 1 y codifica un polipéptido en fase con el polipéptido codificado por el polinucleótido de (a); en que la proteína de fusión puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. También se describen en el presente documento los vectores que contienen estos ácidos nucleicos y las células huésped que contienen los vectores y/o los ácidos nucleicos.

La invención proporciona un procedimiento de fabricación de una proteína BTNL9 multimérica como se reivindica en el presente documento, que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene los ácidos nucleicos que codifican la proteína BTNL9 en un medio bajo condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico y la recuperación de la proteína BTNL9 que se expresa de la masa celular o el medio de cultivo.

En otro aspecto más, se proporciona una proteína BTNL9 multimérica como se reivindica en el presente documento para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, que comprende la administración al paciente de una dosis terapéuticamente eficaz de una proteína BTNL9 multimérica soluble que comprende los polipéptidos (a) y (b) que tienen la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, en que la ventana de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de (a) y (b) con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 es al menos de 80 aminoácidos de longitud, en que la BTNL9 multimérica es al menos un tetrámero y/o tiene un peso molecular cuatro veces mayor que el de un polipéptido de (a), y en que la proteína BTNL9 multimérica puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3. La enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria puede ser artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, psoriasis, sarcoidosis, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, o una enfermedad fibrótica.

También se describe en el presente documento un procedimiento para inhibir la proliferación de linfocitos T, que comprende la adición al linfocito T (1) cualquier proteína BTNL9 que comprende la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 35, 36, 37, 38, 39, o 40 al 253, 254, 255, 256 o 257 de la SEC ID N° 2 o (2) una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 o que comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 5, 10, 15, o 20 inserciones, delecciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, en que la proteína BTNL9 puede inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados por un anticuerpo anti-CD3. Este procedimiento engloba el uso de una proteína BTNL9 multimérica soluble, las proteínas de fusión BTNL9, o la proteína BTNL9 soluble tratada anteriormente para inhibir la proliferación de linfocitos T. Esta inhibición de la proliferación de linfocitos T puede producirse *in vitro* o *in vivo*.

También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar un paciente que tiene una enfermedad inmunitaria o inflamatoria que comprende la administración al paciente de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-BTNL9, en que el anticuerpo anti-BTNL9 aumenta la inhibición de la proliferación de linfocitos T por la proteína BTNL9 multimérica soluble, una de las proteínas de fusión BTNL9, y/o la proteína BTNL9 soluble como se ha tratado anteriormente y en que el anticuerpo anti-BTNL9 se une a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2.

También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar un paciente que tiene una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, como se describe en el presente documento, que comprende la administración al paciente de una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-BTNL9, en que el anticuerpo anti-BTNL9 se puede unir a una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2. El anticuerpo anti-BTNL9 se puede unir a una proteína BTNL9 de la superficie celular e induce una cascada de señalización intracelular por medio del dominio B30.2 de BTNL9.

También se describe en el presente documento un tratamiento para un paciente de cáncer que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une a una proteína BTNL9 que consiste en los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2. El cáncer puede ser, por ejemplo, leucemias agudas o crónicas, linfoma, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemias linfocíticas, linfomas linfocíticos o cutáneos, carcinomas, sarcomas, timomas, neoplasias del mediastino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, varios tipos de cáncer de piel, cáncer de vejiga, gliomas malignos, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, neoplasias hepatobiliares, cáncer de intestino delgado, colon o recto, cáncer de riñón o uréter, cáncer testicular, cáncer de la uretra o pene, tumores ginecológicos, cáncer de ovarios, sarcomas de huesos, cánceres del sistema endocrino, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, neoplasias del sistema nervioso central, y neoplasias de células plasmáticas. El anticuerpo puede ser un anticuerpo antagonista.

Finalmente, se describe un procedimiento en el presente documento para vacunar un paciente contra un cáncer, que comprende la administración al paciente de un antígeno que se expresa altamente en las células cancerosas y un anticuerpo antagonista que se une a una proteína que consiste en los aminoácidos 35 a 257 de la SEC ID N° 2.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Se representan las estructuras de dominio de proteínas humanas que son parte de la familia de proteínas tipo butirofilinas (BTNL). Cada óvalo o círculo representa un dominio proteico. Los dominios se indican de la siguiente manera: , dominio de la región variable tipo inmunoglobulina (tipo IgV); , dominio de la región constante tipo inmunoglobulina (tipo IgC); , dominio tipo inmunoglobulina (tipo Ig); , dominio transmembrana; y, . Las regiones que no se identifican con una estructura de dominio particular se indican con una línea horizontal.

Figura 2: Esta figura indica la cantidad relativa del ARNm BTNL9 presente en varias células inmunitarias humanas primarias. Se aislaron las células de paquetes leucocitarios o sangre entera de donantes humanos normales, y se evaluó el ARN por hibridación con una matriz Affymetrix (Affymetrix GENECHIP™ HG-U133 Plus 2.0). El eje vertical indica el valor de expresión de ARNm BTNL9 generado utilizando el ROSETTA RESOLVER®. Los distintos tipos de células ensayadas se indican a lo largo del eje x de la siguiente manera: 1, células mononucleares de sangre periférica; 2, células CD3⁺; 3, células CD4⁺; 4, células CD8⁺; 5, linfocitos T reguladores; 6, células CD19⁺; 7, linfocitos citotóxicos naturales (NK); 8, linfocitos T NK; 9, monocitos; 10, macrófagos; 11, eosinófilos; 12, neutrófilos; 13, basófilos; y 14, plaquetas. Los procedimientos se describen con detalle en el Ejemplo 1.

Figura 3: Esta figura muestra los niveles relativos de expresión de ARNm BTNL9 en diferentes tejidos de humanos adultos como se determinaron por hibridación con una sonda BTNL9 en una micromatriz. Los valores de intensidad de la expresión de ARNm BTNL9 se indican en el eje vertical. Los diferentes tejidos se indican en el eje horizontal de la siguiente manera: 1, glándula adrenal; 2, vejiga; 3, carcinoma de vejiga; 4, médula ósea; 5, células mononucleares de médula ósea; 6, cerebro; 7, mama; 8, colon; 9, células de adenocarcinoma de colon; 10, margen de apariencia normal de una biopsia de colon; 11, corazón; 12, próstata hiperplásica; 13, íleon de un paciente de linfoma no Hodgkin; 14, margen de apariencia normal de una biopsia de íleon; 15, riñón; 16, carcinoma de células escamosas de laringe; 17, margen de apariencia normal de biopsia de laringe; 18, hígado; 19, pulmón; 20, ovario; 21, placenta; 22, próstata; 23, músculo esquelético; 24, piel; 25, intestino delgado; 26, bazo; 27, testículo; 28, timo; y 29, tejido adiposo blanco. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 1.

Figura 4: Esta figura indica los niveles de proliferación de linfocitos T CD4⁺ de ratón que se han activado con un anticuerpo anti-CD3 (clon 2C11) en presencia de varias proteínas que incluyen las siguientes: 1) , fragmento Fc de una preparación de IgG humana a 10 µg/ml; 2) , Fragmento Fc de una preparación de IgG humana a 2 µg/ml; 3) , proteína de fusión B7-2.Fc humana (adquirida en R&D Biosystems) a 0,5 µg/ml; 4) , proteína de fusión BTNL2.Fc a 5 µg/ml; 5) , BTNL9.Fc humana a 10 µg/ml; y 6) , BTNL9.Fc humana a 2 µg/ml. Los asteriscos en las calles 4-6 indican que estos resultados son significativamente menores que los resultados de los ensayos de control. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 3.

Figura 5: Esta figura indica los niveles de proliferación de linfocitos T que se han activado con un anticuerpo anti-CD3 en presencia de distintas proteínas que incluyen las siguientes: (1) ninguna proteína adicional; (2) una proteína de fusión Fc que se sabe que no tiene efecto sobre la proliferación de linfocitos T (p7.5-Fc) a 10 µg/ml; (3) p7.5-Fc a 2,5 µg/ml; (4) BTNL9.Fc humana a 20 µg/ml; (5) BTNL9.Fc humana a 10 µg/ml; (6) BTNL9.Fc a 5 µg/ml; (7) BTNL9.Fc a 2,5 µg/ml; y (8) BTNL2.Fc de ratón a 10 µg/ml. Los asteriscos sobre las calles 4 y 8 indican que estos datos son significativamente diferentes de los del ensayo de control que se representa en la calle 2. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 4.

Figura 6: Las figuras 6A-6E muestran los niveles de producción de distintas citoquinas por los linfocitos T CD4⁺ en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CD3 y varias proteínas adicionales. Los paneles 6A, 6B, 6C, 6D, y 6E muestran los niveles de interleucina-2, factor-α de necrosis tumoral, interferón-γ, interleucina-17, e interleucina-13, respectivamente como se indica. Las calles en los gráficos de barras de los paneles 6A-6E son el resultado de los ensayos que contenían las siguientes: (1) células sin anticuerpo anti-CD3; (2) células con anticuerpo anti-CD3, pero sin proteínas adicionales; (3) células con anticuerpo anti-CD3 y una preparación de IgG humana; (4) células con anticuerpo anti-CD3 más la proteína de fusión p7.5-Fc; (5) células con anticuerpo anti-CD3 y la proteína de fusión HB15-Fc, que se sabe que no tiene efecto sobre la proliferación de linfocitos T; (6) células con anticuerpo anti-CD3 y la proteína BTNL2.Fc de ratón; y (7) células con anticuerpo anti-CD3 y proteína BTNL9.Fc humana. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 5.

Figura 7: Esta figura muestra los resultados de los ensayo para medir la muerte celular midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), como se explica con detalle en el Ejemplo 7. El panel 7A muestra los resultados del ensayo LDH, y el panel 7B muestra los resultados de un ensayo de proliferación hecho con las mismas células. Las células utilizadas en este ensayo eran linfocitos T CD4⁺ de ratón. Las distintas calles en los paneles 7A y 7B muestran los resultados de los ensayos con y sin linfocitos T activados, y con o sin ingredientes adicionales, de la siguiente manera: (1) linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3; (2) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 más una preparación de IgG humana; (3) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 más HB15-Fc; (4) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 más p7.5-Fc; (5) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 más BTNL2.Fc de ratón; (6) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 más BTNL9.Fc; y (7) linfocitos T con el anticuerpo anti-CD3 B7-1-Fc. En el panel 7A la calle (8) muestra los datos del ensayo LDH hecho con el medio sin linfocitos T, y la calle (9) muestra los datos del ensayo hecho con linfocitos T más triton X-100, que es un control positivo que representa un 100% de muerte celular.

Figura 8: Esta figura muestra los niveles de expresión de ARNm BTNL9 en tejidos de colon de donantes normales y de donantes que tienen colitis ulcerativa (UC) o enfermedad de Crohn (Crohns), como se indica. Cada punto representa los datos de un donante. La diferencia en la expresión entre el tejido normal y enfermo era estadísticamente significativo tanto para los tejidos de UC como para Crohns, como se indica por el asterisco.

Figura 9: Esta figura muestra los análisis de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de fracciones agrupadas resultantes de la purificación de la SEC.

Figura 10: Esta figura muestra los niveles de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ en respuesta al anticuerpo anti-CD3, con o sin proteínas adicionales, que se indica de la siguiente manera: (1) con el anticuerpo anti-CD3 solo; (2) con el anticuerpo anti-CD3 más HB15-Fc; (3) con el anticuerpo anti-CD3 más una preparación de IgG humana; (4) con el anticuerpo anti-CD3 más el fragmento Fc de una preparación de IgG humana; (5) con el anticuerpo anti-CD3 más la BTNL2.Fc de ratón; (6) con el anticuerpo anti-CD3 más la fracción 1 de BTNL9.Fc; (7) con el anticuerpo anti-CD3 más la fracción 2 de BTNL9.Fc; (8) con el anticuerpo anti-CD3 más la fracción 3 de BTNL9.Fc. Los asteriscos dobles indican una diferencia significativa con los valores de control. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 9.

Figura 11: Esta figura muestra los niveles de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ en presencia de un anticuerpo anti-CD3, con o sin varias proteínas adicionales. Las marcas de calles son las mismas que las de la figura 10. Los procedimientos se describen en el Ejemplo 9.

Figura 12: Como se explica en el Ejemplo 10, esta figura muestra tejido de bazo humano teñido con DAPI (izquierda), un anticuerpo anti-BTNL9 (en el medio), y CD31 (derecha).

Breve descripción del listado de secuencias

SEC ID N° 1: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la proteína BTNL9 humana de longitud completa como se desvela en la secuencia NCBI de referencia NM_152547.4.

SEC ID N° 2: Secuencia de aminoácidos de longitud completa de BTNL9 humana, que es una traducción de la secuencia de aminoácidos de la Secuencia NCBI de referencia NM_152547.4.

SEC ID N° 3: Secuencia de aminoácidos de una secuencia de señal IgK.

SEC ID N° 4: Secuencia de aminoácidos de una secuencia de señal para la hormona de crecimiento humana.

SEC ID N° 5: Secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifica la proteína BTNL9 de ratón de longitud completa como se desvela en la Secuencia NCBI de referencia NM_172793.2.

SEC ID N° 6: Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la BTNL9 de ratón, que es una traducción de la secuencia de nucleótido desvelada en la Secuencia NCBI de referencia N° NM_172793.2.

5 **SEC ID N° 7:** Secuencia de nucleótidos de longitud completa del ADNc BTNL9 humano empalmado alternativamente como se ha desvelado en la Secuencia NCBI de referencia BC062459.1.

SEC ID N° 8: Secuencia de aminoácidos de longitud completa de una BTNL9 empalmada alternativamente, que es una traducción de la secuencia de nucleótidos de la Secuencia NCBI de referencia BC062459.1.

SEC ID N° 9: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

10 **SEC ID N° 10:** Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 11: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 12: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 13: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 14: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

15 **SEC ID N° 15:** Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 16: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 17: Secuencia de aminoácidos de un engarce.

SEC ID N° 18: Secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de fusión (BTNL9.Fc) que comprende la región extracelular de la BTNL9 humana, un engarce y una región Fc.

20 **SEC ID N° 19:** Secuencia de aminoácidos de BTNL9.Fc.

SEC ID N° 20: Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión BTNL2.Fc que contiene la región extracelular de la BTNL2 murina y una región Fc de IgG humana.

SEC ID N° 21: Secuencia de aminoácidos de la BTNL2.Fc codificada por la SEC ID N° 20.

Descripción detallada

25 La invención proporciona proteínas BTNL9 multiméricas solubles, incluyendo variantes de las mismas, y usos para tales proteínas, así como el uso de ácidos nucleicos que codifican BTNL9 para la producción de una proteína BTNL9 multimérica de acuerdo con la invención. Las proteínas BTNL9 pueden alterar la función de linfocitos T atenuando la activación, proliferación y producción de citoquinas de los linfocitos T. Tales efectos pueden dar lugar a tratamientos eficaces para enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias mediadas por linfocitos T tales como enfermedades
30 intestinales inflamatorias y trastornos fibróticos, entre otros varios. Los inhibidores de la BTNL9 pueden actuar para evitar que la BTNL9 atenúe la activación, proliferación y secreción de linfocitos T, y de esta manera, dar lugar a un aumento total de la activación de linfocitos T. Tales efectos pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer o para aumentar la eficacia de una vacuna. Los agonistas de BTNL9 pueden ser capaces de alterar la función celular inmunitaria, por ejemplo, alterando el estado de activación de los linfocitos B, que expresan la proteína BTNL9.
35

Definiciones

Un “anticuerpo”, como significa en el presente documento, comprende una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina y/o una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina. Un anticuerpo puede ser de longitud completa, un anticuerpo tetramérico que comprende una región variable de cadena ligera (V_L), una región constante de cadena ligera (C_L), una región variable de cadena pesada (V_H), una primera región constante de cadena pesada (C_{H1}), una región bisagra, una segunda región constante de cadena pesada (C_{H2}), una tercera región constante de cadena pesada (C_{H3}), tal como un anticuerpo IgG, IgA, IgD, IgM, o IgE. De manera alternativa, un anticuerpo puede ser un fragmento tal como un fragmento Fab o, de manera opcional, un fragmento recombinante, tal como un fragmento scFv. Los anticuerpos de dominio único que comprenden una única región variable sea una región V_H o una V_L , también son anticuerpos con el significado del presente documento. Los anticuerpos de dominio único se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. US 2006/0062784. Además se engloban en el significado de “anticuerpo” varias formas de moléculas monovalentes (incluyendo anticuerpos de cadena sencilla tales como scFv, Fab, scFv-Fc, dominios de anticuerpo, y varios formatos que se describen, por ejemplo, en la Solicitud internacional WO 2009/089004 y la Patente de EE. UU. 5.837.821) y las moléculas multivalentes (tales como $F(ab)_2$ y los que se describen, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO
40
45
50

2009/089004 y la Patente de EE. UU. 5.837.821) se engloban en el significado de “anticuerpo”.

Se dice en múltiples lugares del presente documento que una especie multimérica de una proteína tiene un peso molecular de “**al menos aproximadamente**” cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, o dieciséis veces el de una especie monomérica de la proteína. Aunque este significado es plano, esta frase significa específicamente la inclusión de especies que son aproximadamente cuatro, cinco, seis, etc., veces mayores que un monómero y no solo combinaciones de tales especies con especies mayores. De manera similar, se dice en múltiples sitios que un multímero es “al menos” un tetrámero, etc. Esta frase significa específicamente que incluye especies que son tetrámeros, etc. y no solo combinaciones de especies establecidas con especies mayores.

“**Proteínas BTNL9**”, con el significado del presente documento, incluye proteínas BTNL9 humanas de longitud completa y fragmentos y/o variantes de las mismas, que incluyen proteínas codificadas por variantes alélicas de origen natural del gen BTNL9, así como proteínas BTNL9 producidas recombinantemente, que pueden contener algunos cambios en la secuencia con respecto a las proteínas BTNL9 de origen natural.

Un “**scFv**” es un anticuerpo de cadena sencilla que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región variable de cadena ligera (V_L) y no comprende una región constante de anticuerpo. Los scFv pueden comprender también un engarce de longitud variable entre las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera. Aunque un scFv se puede fusionar con otras secuencias de aminoácidos, la parte de una proteína que se denomina scFv no comprende preferentemente una cantidad sustancial de secuencia de aminoácido distinta de una región V_H , una región V_L , y, opcionalmente, un engarce que une estas secuencias.

Una “**región Fc**” o una “**parte Fc**” o un “**fragmento Fc**” de un anticuerpo (que se consideran lo mismo en el presente documento) es un fragmento de cadena pesada que comprende un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y una región bisagra o una variante de tal fragmento. Un fragmento Fc no comprende un dominio C_{H1} o un dominio V_H . Véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology*, Segunda Edición, p. 110-11, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1994). Un fragmento Fc puede ser del isotipo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgA, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 u otros subtipos. Las variantes de las regiones Fc, como significa en el presente documento, pueden comprender desde 1 a 30 (incluyendo específicamente no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) inserciones, deleciones o sustituciones de un único aminoácido con respecto a una región Fc de origen natural. Una región Fc de origen natural o “nativa” tiene una secuencia que se produce en la naturaleza en un organismo vivo, por ejemplo, una región Fc de un ser humano o un ratón. Por lo tanto, una región Fc “nativa humana” tiene una secuencia de aminoácidos que se encuentra en una región Fc humana de origen natural. Las directrices de dónde se pueden tolerar variaciones sin que afecten la función se pueden encontrar en la técnica. Por ejemplo, las alteraciones de restos de aminoácido identificados en la Patente de EE. UU. 5.807.706 y la Solicitud Internacional WO 2009/089004, se pueden utilizar para estimular la formación de heterodímeros en comparación con la formación de homodímeros. De manera similar, las alteraciones de la región Fc que no evitan la unión con el receptor Fc neonatal, FcRn, se engloban en las alteraciones que se pueden producir en las variantes de Fc según el significado del presente documento. La unión de una región Fc al FcRn puede establecerse a aproximadamente un pH 6 utilizando un instrumento Biacore, tal como un Biacore 3000. El FcRn se puede acoplar a un chip CM5 utilizando procesos químicos de referencia. La proteína que contiene Fc puede ser parte de la fase móvil, y se puede medir la respuesta en unidades de resonancia. Las alteraciones de las regiones Fc se describen, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO 97/34631. De manera alternativa, las comparaciones de, por ejemplo, las secuencias de IgG en y entre especies pueden localizar aminoácidos altamente conservados, que sugerirían a un experto en la técnica que una alteración en estos aminoácidos puede afectar la estructura y/o la función. Están disponibles numerosos alineamientos de secuencias de bisagra, regiones C_{H2} y C_{H3} (que forman juntas la región Fc) en, por ejemplo, Kabat y col., *Sequences of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Publicación N° 91-3242, 1991. Por otra parte, los aminoácidos que varían entre las distintas IgG son sitios en los que la variación se tolera probablemente sin afectar a la función. De manera similar, las variantes de Fc que tienen otras propiedades deseadas, tales como el aumento o disminución de funciones efectoras, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y/o la unión con C1q, que da lugar a la fijación de complemento, se engloban en el significado de variantes Fc.

La expresión “**anticuerpo de longitud completa**” se refiere a una molécula similar en estructura a un anticuerpo de origen natural, es decir, que contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras enteras. Véase, por ejemplo, Kabat y col., *supra* o Kuby, *Immunology*, Segunda Edición, p. 109-32, W. H. Freeman and Co., Nueva York (1994) que tratan de la estructura de los anticuerpos de origen natural. También se incluye entre los “anticuerpos de longitud completa” los anticuerpos de estructura similar a los anticuerpos de dromedario de origen natural que contienen solamente dos cadenas pesadas completas (a menudo con una región CDR3 inusualmente larga) y sin cadenas ligeras (Muldermans y col. (2001), *J. Biotechnol.* 74:277-302; Desmyter y col. (2001), *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290).

Una proteína “**multimérica**”, tal como una proteína BTNL9 multimérica, es una proteína que comprende más de una cadena polipeptídica. El término “multímero” engloba términos tales como “dímero”, “trímero” o “tetrámero” que especifican exactamente cuántas cadenas polipeptídicas contiene el multímero. La proteína BTNL9 multimérica de la invención es al menos un tetrámero. Un “homomultímero” consiste en dos o más copias de la misma cadena polipeptídica y no contiene diferentes cadenas polipeptídicas. De manera similar, un “homodímero” consiste en dos copias de la misma cadena polipeptídica, un “homotrímero” consiste en tres copias de la misma cadena

polipeptídica, etc. Un “heteromultímero” contiene al menos dos cadenas polipeptídicas diferentes. Si el heteromultímero tiene tres o más cadenas polipeptídicas, algunas de ellas pueden ser idénticas entre ellas siempre y cuando al menos una sea diferente de las otras. Cuando se dice que una proteína es “al menos un tetrámero”, significa que es un tetrámero o un multímero de mayor orden. Significados similares se deberían suscribir con “al menos un pentámero”, etc.

Un “**fragmento Fab**” es un fragmento de anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende una región V_L y una región C_L y una parte de una cadena pesada que comprende una región V_H y una región C_H1 . Un fragmento Fab no comprende una región C_H2 o una región C_H3 . Véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology*, Segunda Edición, pp.110-11 W.H. Freeman and Co., Nueva York (1994) que trata de lo que son los fragmentos Fab. Los diferentes tipos de fragmentos Fab pueden contener o ninguna región bisagra, o una parte de la región bisagra o una región bisagra completa.

Un “**scFv-Fc**” como se utiliza en el presente documento, es una proteína recombinante que es una fusión de un scFv con una región Fc. Véase Li y col. (2000), *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252; Powers y col. (2001), *J. Immunol. Methods* 251:123-135; Gilliland y col. (1996), *Tissue Antigens* 47:1-20.

Una proteína o anticuerpo “**recombinante**” es el que resulta del proceso de modificación genética. La expresión “**modificación genética**” se refiere a un procedimiento de ADN o ARN recombinante que se utiliza para crear una célula que expresa un gen a niveles elevados o a niveles disminuidos, o que expresa una forma mutante del gen. En otras palabras, la célula se ha transfectado, transformado o transducido con una molécula de polinucleótido recombinante, y de esta manera se ha alterado de forma que se produce en la célula la alteración de la expresión de un polipéptido deseado.

Las proteínas solubles segregadas y las proteínas que se expresan en la superficie celular a menudo comprenden una “**secuencia de señal**” N terminal, que es una secuencia hidrófoba que interviene en la inserción de la proteína por medio de la membrana que se une al retículo endoplásmico (ER) en una célula eucariota. Las proteínas transmembrana tipo 1 también comprenden secuencias de señal. “Secuencias de señal” en el presente documento significa que son secuencias hidrófobas aminotermiales que habitualmente se eliminan enzimáticamente después de la inserción de parte o toda la proteína a través de la membrana del ER en la luz del ER. Por lo tanto, se sabe en la técnica que una secuencia de señal puede estar presente como parte de una forma precursora de una proteína segregada o transmembrana, pero generalmente estará ausente en la forma madura de la proteína. Cuando se dice que una proteína comprende una secuencia de señal, se entenderá que, aunque la forma precursora de la proteína contiene la secuencia de señal, la forma madura de la proteína probablemente no contendrá la secuencia de señal. Las secuencias de señal contienen un resto adyacente e inmediatamente corriente arriba del sitio de escisión (posición -1) y otro resto en la posición -3, que son importantes para esta escisión enzimática. Nielsen y col. (1997), *Protein Eng.* 10(1): 1-6; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1985), *J. Mol. Biol.* 184:99-105 describen las secuencias de señal y cómo identificarlas. Las secuencias de señal se pueden identificar como describen Nielsen y col., (*supra*). Ejemplos de péptidos o secuencias de señal que son funcionales en células huésped de mamífero incluyen los siguientes: la secuencia de señal para la interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de EE. UU. 4.965.195; la secuencia de señal para el receptor de la interleucina-2 descrita en Cosman y col., ((1984), *Nature* 312:768); el péptido de señal del receptor de la interleucina-4 descrito en la Patente EP 0 367 566; la secuencia de señal del receptor tipo I de la interleucina-1 descrito en la Patente de EE. UU. 4.968.607; el péptido de señal del receptor tipo II de la interleucina-1 descrito en la Patente EP 0 460 846; la secuencia de señal de IgK humana (que es METDTLLLWVLLLWVPGSTG; SEC ID N° 3); y la secuencia de señal de la hormona de crecimiento humana (MATGSRSTLLAFGLLCLPWLQEGSA; SEC ID N° 4). Se conocen muchas otras secuencias de señal en la técnica.

Un dominio “**tipo inmunoglobulina**” (tipo Ig), como significa en el presente documento se distingue principalmente por su estructura terciaria. Véase Bork y col. (1994), *J. Mol. Biol.* 242: 309-20; Hunkapiller y Hood (1989). *Adv. Immunol.* 44: 1-63; Williams y Barclay (1988), *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405. Sin embargo, dominios variables y constantes de tipo inmunoglobulina contienen un puñado de aminoácidos altamente conservados que existen en las posiciones conservadas en su secuencia primaria de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Kabat y col. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publicación N° 91-3242. Tales aminoácidos conservados en las regiones variables y en las regiones constantes CH1 y CH2 se tratan con detalle en por ejemplo, Harpaz y Chothia (1994), *J. Mol. Biol.* 238: 528-39 y Williams y Barclay (1988), *Ann. Rev. Immunol.* 6: 381-405. La presencia de tales aminoácidos altamente conservados o variantes conservadoras de los mismos que existen con el espaciado apropiado puede indicar la presencia de un dominio tipo IgC o tipo IgV.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, se puede determinar comparando la información de secuencia utilizando un programa de computadora GAP, es decir, el paquete Wisconsin del programa de Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI) versión 10.0, GAP (Devereux y col. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12: 387-95). Los parámetros preferidos para el programa GAP incluyen: (1) La implementación GCG de una matriz unitaria de comparación (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para los nucleótidos, y la matriz de comparación de aminoácidos sopesados de Gribskov y Burgess, ((1986) *Nucleic Acids Res.* 14: 6745) que se describen en *Atlas of Polypeptide Sequence and Structure*. Schwartz y Dayhoff, eds.. National

Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979) u otras matrices de comparación comparables; (2) una falta de 8 para cada hueco y una falta adicional de 2 para cada símbolo en cada hueco para las secuencias de aminoácidos, o una falta de 50 para cada hueco y una falta adicional de 3 para cada símbolo de cada hueco para las secuencias de nucleótidos; (3) no hay faltas para los huecos terminales; y (4) no hay una falta máxima para huecos largos.

En conexión con las comparaciones para determinar la identidad de secuencia de polinucleótidos o polipéptidos, lo que significa una **“ventana de alineamiento”** es la parte de polinucleótido o polipéptido que tiene una coincidencia, parcial o total, con otro polinucleótido o polipéptido por el programa de computadora GAP (Devereux y col. (1984), Nucleic Acids Res. 12: 387-95) utilizando los parámetros establecidos en el presente documento. Por ejemplo, cuando un polipéptido de 20 aminoácidos se alinea con una proteína considerablemente más larga y los primeros 10 aminoácidos coinciden exactamente con los de la proteína más larga mientras que los últimos 10 aminoácidos no coinciden en absoluto con la proteína más larga, la ventana de alineamiento es de 10 aminoácidos. Si, por otra parte, el primer aminoácido y el último del polipéptido de 20 aminoácidos coinciden con la proteína más larga, y hay otras 8 coincidencias dispersas entre estos, la ventana de alineamiento es de 20 aminoácidos de longitud. Sin embargo, los tramos largos en cualquiera de las cadenas alineadas sin aminoácidos idénticos o sustituidos conservadoramente o sin nucleótidos idénticos de al menos, por ejemplo, 25 aminoácidos o 75 nucleótidos constituyen un punto final de una ventana de alineamiento, según el significado del presente documento. Las ventanas de alineamiento para una comparación de secuencias puede ser de al menos aproximadamente 25, 50, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 225, 300, 400, 450, 500 o 600 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Dos secuencias de polipéptidos o nucleótidos se consideran **“sustancialmente similares”** cuando son al menos idénticas en un 90% como se determina utilizando el programa GAP como se ha descrito anteriormente y tienen una actividad biológica similar. En el caso de la BTNL9, la actividad biológica que se va a ensayar para determinar si dos secuencias son sustancialmente similares es la capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3.

La familia BTNL

La BTNL9 se ha situado en la familia de proteínas tipo butirofilina (BTNL) basándose en la estructura de sus dominios. Véase por ejemplo, Arnett y col. (2008), Current Immunology Reviews 4: 43-52 y Arnett y col. (2009) Cytokine 46: 370-75. Las proteínas humanas de la familia BTNL incluyen la BTNL2, BTNL3, BTNL8, BTNL9, ERMAP y MOG, y las estructuras de los dominios de estas proteínas se muestran gráficamente en la Figura 1. Como es aparente en la Figura 1, la BTNL2 es el único miembro de la familia que tiene cuatro dominios tipo inmunoglobulina (tipo Ig) en su región extracelular, dos dominios tipo IgV y dos tipo IgC. MOG y ERMAP tiene cada una solo un dominio tipo Ig. BTNL3, BTNL8 y BTNL9 también tienen un dominio extracelular que es claramente un dominio tipo Ig y otro dominio que es aproximadamente del tamaño correcto para ser un dominio tipo Ig, aunque le faltan algunas de las características de los dominios tipo Ig. Todos los miembros de la familia BTNL tienen un dominio transmembrana. BTNL2 y MOG tienen regiones intracelulares cortas; mientras que BTNL3, BTNL8, BTNL9 y ERMAP tienen regiones intracelulares más largas que contienen un dominio B30.2. La función del B30.2 intracelular es desconocida, aunque las mutaciones de los dominios B30.2 de algunas proteínas se han asociado con ciertas enfermedades. Véase Henry y col. (1998), Mol. Biol. Evol. 15: 1696-1705. Además, se han identificado las parejas de unión de algunos dominios B30.2. Véase, por ejemplo, Jeong y col. (2009). J. Biol. Chem. 284: 22444-22456.

El grado de identidad de secuencia compartido por BTNL9 con los otros miembros humanos de la familia BTNL se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Porcentaje de identidad entre miembros humanos de la familia de proteínas BTNL

	BTNL2	BTNL3	BTNL8	ERMAP	MOG
BTNL9	35%	42%	43%	36%	34%

Como se muestra en la Figura 1, BTNL3, BTNL8 y BTNL9 tienen estructuras de dominio similares. La identidad de secuencia de la proteína BTNL9 con las proteínas BTNL3 y BTNL8 es ligeramente superior que con las otras proteínas BTNL. Las proteínas BTNL3 y BTNL8 son idénticas en el 69% una con otra.

Más allá de los niveles de identidad de secuencia, ciertos sitios en la familia de proteínas BTNL están altamente conservados como se muestra en la Tabla 3 posterior, que es un alineamiento de las seis proteínas tipo BTNL humana. Por debajo del alineamiento está la secuencia de consenso. Si se produce el consenso de aminoácidos en todas las proteínas en las que la secuencia abarca esa porción del alineamiento, se muestra en negrita. Si esto se produce en todas menos una de las proteínas en las que la secuencia abarca la porción del alineamiento, aparece en una fuente normal. Si un sitio tiene en todos los casos uno de dos o más aminoácidos, cada uno de los cuales son variaciones conservadoras del otro, estos aminoácidos se enumeran debajo de esa posición en fuente negrita. Si un sitio tiene en todas menos en una secuencia que abarcan esa posición del alineamiento uno de dos o más aminoácidos, cada uno de los cuales son variaciones conservadoras del otro, estos aminoácidos se enumeran debajo de esa posición en fuente normal. La numeración por encima de los alineamientos en la Tabla 2 es la

numeración de la SEC ID N° 2, que es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la BTNL9 humana, que incluye la secuencia de señal, la cual termina en la posición 34 de la SEC ID N° 2.

Tabla 2: Alineamiento y consenso de la secuencia de proteínas BTNL

					40
BTNL3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	AFVLILVLSF	YELVSGWQV
BTNL8	~~~~~	~~~~~	~~~~~	ALMLSLVLSL	LKLGGSGWQV
BTNL9	~~~~~	MVDLSVSPDS	LKPVSLTSSL	VFLMHLLLLQ	PGEPSSEVKV
ERMAP	~~~~~	~~~MEMASS	AGSWLSGCLI	PLVFLRLSVH	VSGHAGD...
MOG	~~~~~	~~~~~MASL	SRPSLPSCLC	SFLLLLLLQV	SSSYAGQFRV
BTNL2	YAEATLWRN	ASAESVSCLV	HNPVLTEEK	SVISLPEKLQ	TELAS..LKV
TODAS				L	S QV
				F	A K
				V	R
	41				87
BTNL3	TGPGKFVQAL	VGEDAVFSCS	LFPETSAEAM	EVRFFRNQF.	..HAWHLR
BTNL8	FGPDQPVQAL	VGEDAAFSCF	LSPKTNAEAM	EVRFFRGQF.	..SSWHLR
BTNL9	LGPEYPILAL	VGEEVEFPCH	LWPQLDAQQM	EIRWFRSQT.	..FNWHLR
ERMAP	AGKFHV..AL	LGGAELLCP	LSLWPGTVPK	EVRWLRSPFP	QRSQAVHIFR
MOG	IGPRHPIRAL	VGDEVELPCR	ISPGKNATGM	EVGWYRPPF.	..SRWHLR
BTNL2	NGPSQPILVR	VGEDIQLTCY	LSPKANASQM	EVRWDRS...	HRYPVHVYIM
TODAS	GP I AL	VGEDA F C	L P A M	EVRW R	VVHLR
	V V	L DEV L	I T	I F	AI IFQ
		I			V
	88				137
BTNL3	DGEDWESKQM	PQYRGRTEFV	KDSIAGGRVS	LRLKNITPSD	IGLYGCWFSS
BTNL8	DGKDQPFMQM	PQYQGRTKLV	KDSIAEGRIS	LRLNITVLD	AGLYGCRISS
BTNL9	EQQELPGRQM	PAFRNRTKLV	KDDIAYGSW	LQLHSIIPSD	KGTYGCRFHS
ERMAP	DGKDQDEDLM	PEYKGRTVLV	RDA.QEGSVT	LQILDVRLED	QGSYRCLIQV
MOG	NGKDQDGDQA	PEYRGRTELL	KDAIGEGKVT	LRIRNVRFSD	EGGFTCCFRD
BTNL2	DGDHVAGEQM	AEYRGRTVLV	SDAIDEGRLT	LQILSARPSD	DGQYRCLFEK
TODAS	DG D QM	P YRGRT LV	KDSI G VT	LRL I D	G Y C F
	E E	A FK FL	R A IS	QI V	F I
		Q	L	A	
	138				187
BTNL3	QIYDEEATWE	LRVAALGSLP	LISIVGYVDG	GIQLLCLSSG	WFPQPTAKWK
BTNL8	QSYQKAIWE	LQVSALGSPV	LISITGYVDR	DIQLLCQSSG	WFPRTAKWK
BTNL9	DNFSGEALWE	LEVAGLGSDP	HLSLEGFKEG	GIQLRLRSSG	WYPKPKVQWR
ERMAP	GNLSKEDTVI	LQVAA....P	SV.....		GSLPSA...
MOG	HSYQEEAAME	LKVED....P	FY.....		W..VSPGV...
BTNL2	DDVYQEASLD	LKVVG LGSSP	LITVEGQEDG	EMQPMCSSDG	WFPQPHVPWR
TODAS	EA E	L V P			W P A
	D				V
	188				237
BTNL3	GPQGQDLSSD	SRANA . DGYS	LYDVEISIV	QENA.GSILC	SIHLAEQSHE
BTNL8	GPQGQDLSTD	SRTNR . DMHG	LFDVEISLTV	QENA.GSISC	SMRHAHLSRE
BTNL9	DHQGQCLPPE	FEAIVWDAQD	LFSLETSVVV	RAGALSNVSV	SIQNLLLSQK
ERMAP		VA	LAVILPVLVL	LIMVCLCLIW	KQRRAKEKLL
MOG		LV	LLAVLPVLLL	QITVGLVFLC	LQYRLRGKLR
BTNL2	DMEGKTIPSS	SQALTQGSHG	LFHVQTLLRV	TNISAVDVTC	SISIPFLGEE
TODAS			LF V L V	A I	
			L L V L	V V	
			Y I I	L	
			A	F	

(continuación)

	238				287
BTNL3	VESKVLIGET	FFQ.PSPWR .	.. LASILLGL	LCGALCGWM	 GM
BTNL8	VESRVQIGDT	FFE . PISWH .	.. LATKVLGI	LCCGLFFGIV	 GL
BTNL9	KELWQIADV	FVPGASAWKS	AFVATLPLLL	VLAALALGVL	RKQRRSREKL
ERMAP	YEHVTEVDNL	L			SDHAKE
MOG	AE . IENLHRT	F			DPHFLRVPCW
BTNL2	KIATFSLSES	.. RMTFLWKT	LLVWGLLLAV	AVGLPRKRS~	~~~~~
TODAS	E I V L				
	288				337
BTNL3	IIVFFKSK ..	 GKIQA	ELDWRRKHGQ	AELRDARKHA	VEVTLDPETA
BTNL8	KIFFSKFQ ..	 WKIQA	ELDWRRKHGQ	AELRDARKHA	VEVTLDPETA
BTNL9	RKQAEKRQEK	LTAELEKLQT	ELDWRRAEQG	AEWRRAAQKYA	VDVTLDPASA
ERMAP	KGKLHKAVKK	LRSELK	... LKRAAAN	SGWRRARLHF	VAVTLDPDTA
MOG	KITLFVIVPV	LGPLVALIIC	YNWLHRRLAG	QFLEELLFHL	EALSG~~~~~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TODAS	K F R L A		RR GQ K AN H	R AR HA LQ L F	V VTL LS
	338				387
BTNL3	HPKLCVS . DL	KTVTHRKAPO	. EVPHSEKRF	TRKSVVAS. Q	GFQAGKHYWE
BTNL8	HPKLCVS . DL	KTVTHRKAPO	. EVPHSEKRF	TRKS VVAS. Q	SFQAGKHYWE
BTNL9	HPSLEVSEDG	KSVSSRGAPP	GPAPGHPQRF	SEQTCALSLE	RFSAGRHYWE
ERMAP	HPKLILSEDQ	RCV.RLGDRR	QPVDPNPQRF	DFVVSILGSE	YFTTGCHYWE
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TODAS	HPKL VS D L	KTV HR APQ S R R	VP KRF A Q	T KS VAS S QT AL I	F AGKHYWE R
	388				436
BTNL3	VDVGQNVGWY	VGVCRRDDVDR	GKNNVTLSNP	NGYWVLRLLT	EHLYFTFNPH
BTNL8	VDGGHNKRWR	VGVCRRDDVDR	RKEYVTLSNP	HGYWVLRLLNG	EHLYFTLNPR
BTNL9	VHVGRRSRWF	LGACLAAPR	A . GPARLSPA	AGYWVLRLLWN	GCEYFVLAPH
ERMAP	VYVGDKTKWI	LGVCSESVS	.KGKVTASPA	NGHWLLRQSR	GNEYEALTSP
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TODAS	V VGQN RW HR K RK	VGVC D V R L A E	K VTLSP A A	NGYWVLRLL H	H LF L PH N F R
	437				485
BTNL3	FISLPPSTPP	TRVGVFLDYE	GGTISFFNTN	DQSLIYTLT	CQFEGLLRPY
BTNL8	FISVFPRTPP	TKIGVFLDYE	CGTISFFNIN	DQSLIYT . LT	CRFEGLLRPY
BTNL9	RVALTLRVPP	RRLGVFLDYE	AGELSFFNVS	DGSHIFTFHD	.TFSGALCAY
ERMAP	QTSFRLKEPP	RCVGIFLDYE	AGVISFYNT	NKSHIFTF.T	HNFSGPLRPF
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
TODAS	SL R PP V K F	RVGVFLDYE KI I L	G ISFFN L Y	DQS IYT T K F	QF G LRPY N F R
	486				526
BTNL3	IQHAMYD . EE	KGTPIFICPV	SWG~~~~~	~~~~~	~~~~~
BTNL8	IEYPSYN . EQ	NGTPIVICPV	TQESEKEASW	QRASAIPTS	NSESSQATT
BTNL9	FRPRAHDGGE	HPDPLTICPL	P	VRGTGVPEEN	DSDTWLQPYE
ERMAP	FEPCLHDGCK	NTAPLVICSE	LHKSEESIVP	RPEGKGHANG	DVSLKVNSSL
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~

(continuación)

	527	535			
BTNL3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~
BTNL8	PFLPRGEM~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~
BTNL9	PADPALDWW~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~
ERMAP	LPPKAPELKD	IILSLPPDLG	PALQELKAPS	F	
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~

Un experto en la técnica apreciará que la secuencia de consenso entre estas proteínas refleja características que pueden ser importantes para la estructura o funciones de estas proteínas. Debido a sus patrones de expresión variables, es probable que estas proteínas no tengan funciones idénticas y, por lo tanto, es improbable que todos los aminoácidos importantes para la función de cada proteína se conserven en la familia. Sin embargo, muchos de los aminoácidos conservados pueden ser importantes para mantener la estructura correcta, la cual es, por supuesto, necesaria para funcionar. En muchos sitios uno de dos o más aminoácidos que son variaciones conservadoras unos de otros se producen en todos o la mayoría de los miembros de la familia BTNL. Un experto en la técnica entendería que tales variaciones conservadoras en BTNL9 probablemente no afectan adversamente a la función. Por ejemplo, en la posición 55 de la SEC ID N° 2 (que tiene la misma numeración que el alineamiento de la Tabla 2 anterior), varios miembros de la familia BTNL tienen uno de tres aminoácidos hidrófobos diferentes, alanina (BTNL3, BTNL8 y ERMAP), isoleucina (BTNL2), o valina (BTNL9 y MOG). Un experto en la técnica comprenderá que un cambio de valina por alanina o isoleucina en esta posición de la secuencia de aminoácidos de BTNL9 sería improbable que afectara a la función. Una consideración similar se aplicaría a todos los sitios en los que se producen variaciones conservadoras dentro de la familia. Por lo tanto la proteína BTNL9, como se describe en el presente documento, incluye proteínas que comprenden la SEC ID N° 2, o un fragmento de la misma, en el que la secuencia se puede alterar por variación conservadora en un sitio donde se produce la variación conservadora entre los miembros de la familia BTNL y en el que la proteína puede inhibir la proliferación de linfocitos T como se mide por el procedimiento descrito en los ejemplos posteriores. Tales sitios incluyen las posiciones 47, 49, 51, 53, 54, 55, 57, 61, 67, 72, 74, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 91, 98, 100, 101, 106, 107, 108, 116, 117, 119, 120, 123, 131, 135, 147, 184, 209, 211, 215, 217, 221, 225, 244, 288, 291, 312, 316, 317, 323, 324, 327, 330, 331, 343, 349, 352, 357, 360, 365, 368, 370, 371, 373, 374, 383, 392, 393, 395, 398, 400, 403, 411, 413, 417, 428, 433, 436, 440, 443, 448, 449, 451, 460, 463, 468, 472, 477, y 485 de la SEC ID N° 2. Además, se pueden tolerar variaciones también en otros sitios de BTNL9 sin afectar la función. Por ejemplo, sería improbable que sustituciones conservadoras en posiciones no conservadas afectaran la función, aunque es posible que haya efectos funcionales en tales sitios.

Por lo tanto, una proteína, como se describe en el presente documento, incluye proteínas que (1) tienen polimorfismos que se producen naturalmente o cambios de aminoácidos que se introducen recombinantemente, (2) son idénticas al menos en un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la SEC ID N° 2 y/o a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, y (3) mantienen la capacidad de atenuar la proliferación de los linfocitos T como se mide por los procedimientos que se describen en el presente documento o actúan como un inhibidor de la BTNL9 nativa. Algunos de tales polimorfismos pueden aumentar la capacidad de una proteína BTNL9 para inhibir la proliferación de linfocitos T y/o pueden hacer que una proteína BTNL9 sea más fácil de producir en un proceso de producción comercial. Otro de tales polimorfismos puede producir un inhibidor de BTNL9 nativa. Estos polimorfismos pueden producirse en los sitios de BTNL9 que no están conservados tales como, por ejemplo, en la posición 41, 44, 45, 46, 48, 56, 58, 60, y cualquier otro sitio que se muestra como no conservado en la Tabla 2.

Los patrones de expresión y las funciones biológicas de las proteínas BTNL se ha explorado en profundidad en algunos casos, pero no en otros. La ERMAP se expresa en la superficie de los glóbulos rojos y no se le ha asignado ninguna función biológica específica. MOG es un componente de la vaina de mielina. Se piensa que ni ERMAP ni MOG tienen un papel en el sistema inmunitario, aunque a menudo se detectan anticuerpos contra MOG en pacientes con esclerosis múltiple. La BTNL1 es homóloga a MOG, y se encuentra BTNL1 en la leche de vaca. Se ha hecho la hipótesis de que el consumo humano de leche de vaca puede dar lugar al desarrollo de anticuerpos contra BTNL1 que tiene reacción cruzada con la MOG humana, dando lugar de esta manera a enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple. Véase Guggenmos y col. (2004). J. Immunol. 172: 61-68. Se ha demostrado que la BTNL2 inhibe la proliferación de linfocitos T y la secreción de citoquinas, pero no la proliferación de linfocitos B. Por lo tanto, se piensa que la BTNL2 actúa como un co-regulador negativo de los acontecimientos mediados por linfocitos T. Véase por ejemplo, la Patente de EE. UU. 7.244.822. Se ha ligado claramente un polimorfismo de BTNL2 con sarcoidosis, sugiriendo que la BTNL2 puede tener un papel iniciando o contribuyendo o respondiendo a esta enfermedad. Valentonyte y col. (2005), Nature Genetics 37(4): 357-64. Se han hallado más posibles asociaciones entre varios polimorfismos de BTNL2 y colitis ulcerativa, artritis reumatoide, miositis espontánea de cuerpos de inclusión, lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo I, lepra tuberculoide, y sensibilidad de IgE específica de antígeno. Arnett y col. (2009), Cytokine 46: 370-75. A BTNL3, 8, y 9 no se les ha asignado ninguna función biológica específica.

Se ha informado de los niveles de ARN que codifican las distintas proteínas BTNL en varios tipos celulares o tejidos. El ARN BTNL9 se expresa relativamente altamente en tejido adiposo, pulmón, timo, bazo, y corazón. Otros

miembros de la familia BTNL tienen distintos patrones de expresión, y en todos menos en uno, la expresión de ARN se ha detectado en células de linaje hematopoyético. Arnett y col. (2009), Cytokine 46: 370-75. Entre los distintos tipos celulares asociados con la función inmunitaria que se han ensayado en cuanto a la expresión de BTNL9, el ARN BTNL9 se expresa predominantemente en linfocitos B. Arnett y col. (2009), Cytokine 46: 370-75. La expresión del ARN BTNL9 en las células que están implicadas en la función inmunitaria sugiere que la BTNL9 puede tener un papel en la función inmunitaria, sea dirigiendo la respuesta inflamatoria o enfriando la respuesta después de una erupción.

Proteína BTNL9

La presente invención engloba las versiones segregadas solubles de BTNL9 que comprenden un dominio transmembrana que se puede expresar sobre la superficie celular, también están descritas en el presente documento. Tales proteínas pueden estar aisladas, es decir, ser parte de una preparación proteica purificada en la que la proteína BTNL9 constituye al menos un 80% o al menos un 90% de la proteína presente en la preparación. También se describen en el presente documento las proteínas BTNL9 codificadas por los ácidos nucleicos BTNL9 descritos posteriormente. Una proteína BTNL9, como se describe en el presente documento, engloba una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, así como los fragmentos, derivados, y variantes de la misma, incluyendo proteínas de fusión y multímeros, como se ha expuesto anterior y posteriormente. La secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, incluye una secuencia de señal que comienza en la posición 1 y termina en una posición desde aproximadamente la posición 29 hasta aproximadamente la posición 38, opcionalmente en la posición 34. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la BTNL9 madura comienza en la posición desde aproximadamente 30 a aproximadamente la posición 39 de la SEC ID N° 2. Opcionalmente, la secuencia de aminoácidos madura de BTNL9 comienza en la posición 35 de la SEC ID N° 2.

La secuencia de señal de BTNL9 está seguida por un dominio tipo Ig que se extiende desde aproximadamente la posición 44 a aproximadamente la posición 150 de la SEC ID N° 2. La siguiente región, desde aproximadamente la posición 151 a aproximadamente la posición 257 de la SEC ID N° 2, se alinea con los dominios tipo IgC de BTNL2, pero carece de alguno de los rasgos característicos de la secuencia que se encuentra comúnmente en un dominio tipo IgC1. Véase, por ejemplo, Williams y Barclay (1988), Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405; Peach y col. (1995), J. Biol. Chem. 270(36): 21181-21187. El dominio transmembrana de BTNL9 comienza aproximadamente en la posición 258 de la SEC ID N° 2 y termina aproximadamente en la posición 277 de la SEC ID N° 2. La parte intracelular de la BTNL9 comienza aproximadamente en la posición 278 y termina en la posición 535 de la SEC ID N° 2. La región intracelular contiene un dominio B30.2 que se extiende desde aproximadamente la posición 328 hasta aproximadamente la posición 486 de la SEC ID N° 2. Un dominio B30.2 es un dominio globular de aproximadamente 170 aminoácidos. Henry y col. tratan los dominios B30.2 con detalle y proporcionan un alineamiento de varios dominios B30.2 y una secuencia de consenso derivada del alineamiento. Henry y col. (1998), Mol. Biol. Evol. 15(12): 1696-1705 muestran (por comparación de secuencias) y explican lo que es un dominio B30.2. Los dominios B30.2 se encuentran también en BTNL3, BTNL8, y ERMAP, todas las cuales son miembros de la familia de proteínas tipo butirofilina, como se ha expuesto en el presente documento. El alineamiento de proteínas BTNL de la Tabla 2 anterior desde aproximadamente la posición 328-486 muestra un alto grado de homología, ciertamente más alta que la que se observa entre la colección más dispar de proteínas que contienen dominios B30.2 alineados por Henry y col. *supra*.

Las proteínas BTNL9, con el significado del presente documento, incluyen hetero y homo-multímeros que comprenden al menos dos proteínas BTNL9. En algunas realizaciones, los multímeros biológicamente activos pueden ser homomultímeros. El tamaño de tales homomultímeros se puede determinar por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no reductoras o por cromatografía de exclusión por tamaño. El tamaño de la proteína BTNL9 monomérica contenida en tales multímeros se puede determinar por electroforesis en gel de poliacrilamida del multímero bajo condiciones reductoras. Se esperaría que tales condiciones rompan los puentes disulfuro e interfieran con las interacciones no covalentes tales como los enlaces hidrógeno o interacciones de cargas. Por lo tanto, se esperaría que los multímeros que se mantienen unidos por enlaces disulfuro o interacciones no covalentes se reduzcan a monómeros bajo las condiciones reductoras. En algunas realizaciones, el tamaño del homomultímero BTNL9 biológicamente activo puede ser al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince o dieciséis veces el tamaño de la proteína BTNL9 monomérica.

Las proteínas BTNL9, con el significado del presente documento, también incluyen las proteínas codificadas por variantes empalmadas de ARNm BTNL9 de longitud completa. El ADNc de longitud completa que codifica la BTNL9 (SEC ID N° 1) contiene once exones, que están en las siguientes posiciones de la SEC ID N° 1: exón 1, posición 1-208; exón 2, posición 209-340; exón 3, posición 341-685; exón 4, posición 686-967; exón 5, posición 968-1084; exón 6, posición 1085-1117; exón 7, posición 1118-1138; exón 8, posición 1139-1159; exón 9, posición 1160-1186; exón 10, posición 1187-1213; y exón 11, posición 1214-3500.

La secuencia codificante se extiende desde la posición 232-1839 de la SEC ID N° 1, siendo los tres últimos nucleótidos el codón de parada. Por lo tanto, la secuencia codificante comienza en el segundo exón. El final del segundo exón se extiende ligeramente más allá del final de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de señal de BTNL9 aproximadamente en la posición 34 de la SEC ID N° 2. El tercer codón codifica los aminoácidos desde aproximadamente la posición 35 a aproximadamente la posición 151 de la SEC ID N° 2, que incluye el

dominio tipo Ig. El cuarto exón codifica la parte de la SEC ID N° 2 desde aproximadamente la posición 152 a aproximadamente la posición 245, en otras palabras la mayoría del dominio siguiente, que tiene algunas de las características de un dominio tipo IgC1. A continuación están los exones 5-10, que son relativamente cortos. El exón 5 codifica el resto del dominio extracelular más el dominio transmembrana, desde aproximadamente la posición 246 a aproximadamente la posición 284 de la SEC ID N° 2. Los exones 6-10 juntos codifican aproximadamente cuarenta y tres aminoácidos, desde aproximadamente la posición 285 a aproximadamente la posición 327 de la SEC ID N° 2. El exón 11 codifica el dominio B30.2, que se extiende desde aproximadamente la posición 328 a aproximadamente la posición 486 de la SEC ID N° 2, y el resto de la proteína termina en la posición 535 de la SEC ID N° 2.

Las proteínas BTNL9, con el significado del presente documento, se pueden codificar por variantes empalmadas que hayan perdido cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o nueve exones. Por ejemplo, una proteína BTNL9 puede codificarse por una variante empalmada que ha perdido el exón 3 o exón 4. Una proteína BTNL9 resultante puede contener el dominio tipo Ig desde aproximadamente la posición 37 a aproximadamente la posición 151 de la SEC ID N° 2, pero no el siguiente dominio desde aproximadamente la posición 152 a aproximadamente la posición 245 de la SEC ID N° 2. De manera alternativa, una proteína BTNL9 resultante puede contener aminoácidos desde aproximadamente la posición 152 a aproximadamente la posición 245 de la SEC ID N° 2, pero no los aminoácidos desde aproximadamente la posición 37 a aproximadamente la posición 151 de la SEC ID N° 2. Una proteína BTNL9 codificada por una variante de transcripción empalmada que pierda los exones 10 y 11 carecería de los aminoácidos que se extienden desde aproximadamente 319 a 535 de la SEC ID N° 2, aunque estos aminoácidos probablemente serían reemplazados por otros aminoácidos codificados por el intrón siguiente al exón 9. Tal transcripción de BTNL9 que carece de los exones 10 y 11 se ha comunicado con el número de registro GenBank BC062459.1, cuya secuencia se da en la SEC ID N° 7. Esta variante empalmada utiliza aparentemente sitios de empalme crípticos que se encuentran en los intrones. La SEC ID N° 8 es una secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 7. Otras proteínas BTNL9 se pueden codificar por variantes empalmadas que carecen del exón 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 o cualquier combinación de estos exones. Las variantes empalmadas pueden utilizar además, sitios de empalme crípticos.

También se describe en el presente documento una proteína BTNL9 que puede ser un fragmento soluble de la proteína transmembrana de longitud completa que comprende la SEC ID N° 2, o una variante de la misma. Una proteína BTNL9 puede comprender un fragmento de BTNL9 que comprende un dominio tipo inmunoglobulina que se extiende desde el resto 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 de la SEC ID N° 2 hasta el resto 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, o 150 de la SEC ID N° 2. Tales fragmentos pueden o no incluir los dominios siguientes que se extienden desde el resto 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, o 160 de la SEC ID N° 2 hasta el resto 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, o 260 de la SEC ID N° 2. Una proteína BTNL9 puede comprender además un fragmento que se extiende desde el resto 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, o 160 de la SEC ID N° 2 hasta el resto 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, o 260 de la SEC ID N° 2. Tales fragmentos pueden incluir o no los dominios precedentes que se extienden desde el resto 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 de la SEC ID N° 2 hasta el resto 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, o 150 de la SEC ID N° 2. Una proteína BTNL9 puede comprender un fragmento que incluye la mayoría o toda la región extracelular de BTNL9. Tal proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos que se extiende desde el resto 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 de la SEC ID N° 2 hasta el resto 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, o 260 de la SEC ID N° 2, opcionalmente desde aproximadamente el resto 37 a aproximadamente el resto 257 de la SEC ID N° 2. Todos estos fragmentos pueden contener variaciones con respecto a la SEC ID N° 2 y pueden contener un número determinado de sustituciones, inserciones o deleciones de un único aminoácido con respecto a la SEC ID N° 2 como se trata posteriormente. Todos estos fragmentos pueden inhibir la proliferación de linfocitos T estimulados por un anticuerpo anti-CD3.

La invención engloba epítomos de proteínas BTNL9 que son útiles para la generación de anticuerpos, que se denominan en el presente documento como fragmentos inmunógenos. Los fragmentos inmunógenos tienen preferentemente al menos 10 aminoácidos de longitud y pueden comprender aminoácidos contiguos a la SEC ID N° 2. Tales epítomos pueden abarcar regiones de una proteína BTNL9 codificada por una unión empalmada, que puede tener la ventaja de unirse específicamente a proteínas codificadas por variantes empalmadas específicas. El epítopo puede localizarse en la región extracelular de BTNL9, desde el aminoácido de la posición 35-257 de la SEC ID N° 2. El epítopo puede estar en el dominio tipo inmunoglobulina que se extiende desde aproximadamente la posición de aminoácidos 44-150 de la SEC ID N° 2 o en el dominio siguiente que se extiende desde aproximadamente la posición de aminoácido 151-257 de la SEC ID N° 2.

Una proteína BTNL9, como se describe en el presente documento, puede contener una o más inserciones, deleciones o sustituciones de un único aminoácido con respecto a la SEC ID N° 2 o a uno de los fragmentos de la SEC ID N° 2 tratados anteriormente. Una proteína BTNL9 puede contener no más de 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de un único aminoácido con respecto a la SEC ID N° 2 o respecto a uno de los fragmentos de la SEC ID N° 2 que se ha tratado anteriormente. Todas tales variantes de proteína BTNL9 mantienen la capacidad de atenuar la proliferación de linfocitos T o pueden actuar como un inhibidor de esta atenuación de la proliferación de linfocitos T por una proteína BTNL9 sin alterar como se ensaya por los procedimientos descritos en el presente documento.

5

15

Tabla 3: alineamiento de las secuencias de aminoácidos de BTNL9 humana y de ratón

```

1 mvdlsvspdskpvslctsslvflmhlllqlpggepsse.vkvlqpeypila 49  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

1 MADFSVFLGFLKQIPRLS.IFFTYYLLFLQLWEVNSDKWVLGPESILA 49  
  

50 lvgeevefpcchlwpqldaqgmeirwfrsqtfnvvhlyqeqqelpgrmpa 99  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

50 RVGEAVEFPCLSSYQDAENMEIRWFRAQVSINVYLVOEPOGRSSLQMAO 99  
  

100 frnrcklvkdidiaygsvvllqlhsliipsdkgtgygrfhdsdnfsgealwele 149  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

100 FRNRTLFEAYDIAEGSVNLHILKVLPSDECRYGCERLSDNFSGEATHELE 149  
  

150 vaglgsgdphtislegfkkeggiaqlrlrrsg-wyppkpqvwrdrhqggclppefe 199  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

150 VAGSGSDPHISLGFGSGGGIOLQCSSSG-WYPKPQVWRGHOGOCISPSE 199  
  

200 aiivdaqdflsfletswvvragalshsvvsignlllsqkkelvvqiadvfv 249  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

200 AITQNAOGLFSLETSIVVRGGANSHVSCIIONPLLPOKKEFVIQIADVFL 249  
  

250 pgasawksafvat...lpl.llvlaalaalgvlrkqrresreklrkqaekrq 295  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

250 PRHSPPHKKAFTGTLLWLPLSLIVLTALRYFYKLRSFOEKQVKQGEEVR 299  
  

296 ekltaeleklqteldwrraeeggaewraaqkyavdvtdpasahpslevse 345  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

300 .....EKLQTELDWRRECGAETHRAAQQAADVTLDPATAMPSLEVSN 342  
  

346 dgksvssrgappgpapghpqrfseqtcalslerfsagrhywevhvgrrsr 395  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

343 NGXTVSSRLGVPSIAAGDPORFSEQTCVLSRERFSSGRHYWEVMVGRRSR 392  
  

396 wflgacslaavpragparlspaagyvwglwngceyvflaphrvaltlrvp 445  

| | | | : : : : : : : : : : ~~~~~~  

393 WFLGACLESVERSGPARLSPAAGYWVGLWNRCYFVLDPHRVALALRV 442  
  

446 prrlgvfldyeagelsffnvsdgshiftfhdttfgalcayfrprahdgge 495  

| | | | : : : : : : : : : : : : : :  

443 PRRIGVLLDYEAOKLSFFNVSDGSHIFSTDTFSGALRAYLRPRANDGSE 492  
  

496 hpdplticplpvrvtgvpceendsdtwlqpypadpalddw..... 535  

| | | | : : : | : : : : : : : : : :  

493 HPDPMTICSLPVRGPOVLEENDNDYNLOPYEPDPA..WAVNEAVS 536
```

Estas secuencias, es decir, las secuencias de aminoácidos humana y murina que se muestran en la Tabla 3, son idénticas en aproximadamente un 71%. De manera interesante, la secuencia del segundo dominio extracelular (desde aproximadamente la posición 306-535 de la SEC ID N° 2) de BTNL9 están más altamente conservados entre las secuencias humanas y de ratón que la secuencia del principio, el dominio extracelular tipo Ig. Un experto en la técnica apreciará que es menos probable que los restos no conservados tengan un papel en la determinación de la estructura terciaria total de una proteína BTNL9 que los restos conservados, ya que en la evolución se conserva más la estructura que la secuencia. Bork y col. (1994). J. Mol. Biol. 242: 309-20. Como se utiliza en el presente documento, "restos no conservados" son aminoácidos en una proteína BTNL9 que no están conservados cuando se comparan las secuencias de la proteína BTNL9 humana y de ratón, como en la Tabla 3. Es menos probable también que los aminoácidos no conservados tengan un papel directo en la función de la BTNL9. Por ejemplo, los restos 50, 54, 62, 63 de la SEC ID N° 2, y muchos otros que se muestran en la Tabla 3 no son ni idénticos ni similares. Por tanto, un experto en la técnica se daría cuenta de sería menos probable que la alteración de restos que no son idénticos ni similares afecte a la función de la proteína BTNL9 de lo que lo sería la alteración de restos idénticos o similares. Además, es menos probable que las sustituciones conservadoras (como se ha descrito en el presente documento) afecten la función de la proteína que las sustituciones no conservadoras. Por otro lado, es más probable que la sustitución o delección de restos conservados (tales como por ejemplo, los restos 43, 44, 47, 48, y 49 de la SEC ID N° 2), especialmente los restos que están conservados en los dominios tipo Ig (tales como los restos 52, 55 y 57 de la SEC ID N° 2) afecten a la función biológica. Un experto en la técnica también apreciará que las sustituciones que descomponen sustancialmente la estructura terciaria de una proteína BTNL9 como se predice por programas tales como, por ejemplo, DALI (Holm y Sander (1993), J. Mol. Biol. 233: 123-38), también probablemente alterarán la función. Por lo tanto, la técnica proporciona una guía considerable en cuanto a qué alteraciones se pueden hacer sin afectar la función. Todas las variantes y derivados de la proteína BTNL9, con el significado del presente documento, pueden inhibir la proliferación de linfocitos T activados con anticuerpo anti-CD3 o pueden inhibir la capacidad de versiones sin mutar de la proteína BTNL9 para hacerlo.

Una proteína BTNL9 como se describe en el presente documento puede ser idéntica al menos en un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la SEC ID N° 2, en que la ventana de alineamiento es al menos de 50, 60, 75, 80, 90, o 100 aminoácidos de longitud y en que la proteína BTNL9 puede inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3. Como se ha tratado anteriormente, las faltas de coincidencia de secuencia con la secuencia de ratón y con otros miembros de la familia BTNL humana pueden guiar al experto en la técnica en cuanto a dónde se pueden hacer las modificaciones en la SEC ID N° 2 sin afectar la función. Las inserciones, delecciones, o sustituciones pueden producirse en, o adyacentes a, los restos que no están conservados entre la BTNL9 humana y de ratón. Estas alteraciones pueden producirse en (en el caso de delecciones o sustituciones) o adyacentes a (en el caso de inserciones) uno o más de los siguientes restos de la SEC ID N° 2: 39, 45, 46, 50, 54, 60, 62-65, 69, 79, 80, 89, 91-95, 98, 99, 105-109, 113, 117, 119, 121, 122, 130, 136, 145, 153, 165-167, 173, 174, 188, 195, 198, 202, 203, 207, 219, 222, 227, 228, 232, 235, 240, 251, 252, 254, y 257. De manera alternativa, una proteína BTNL9 puede contener no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, o 30 sustituciones, delecciones, o inserciones de aminoácidos con respecto a la SEC ID N° 2. Las proteínas descritas anteriormente son proteínas BTNL9 como se describen en el presente documento siempre que puedan inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3.

Las proteínas BTNL9 pueden estar glucosiladas en varios grados o no glucosiladas. Como ilustración, una proteína BTNL9 de la invención puede comprender uno o más sitios de glucosilación ligada a N u O además de los que ya se encuentran en una proteína que comprende la SEC ID N° 2. La SEC ID N° 2 contiene cinco sitios potenciales de glucosilación unida a N en las posiciones 102, 139, 224, 464, y 516. Un experto en la técnica estaría avisado de que los restos de asparagina que son parte de la secuencia Asn Xxx Ser/Thr (en la que Xxx es cualquier aminoácido excepto prolina) puede servir como un sitio de adición de N-glucanos. Además, hay muchos restos de serina y treonina que pueden servir como sitios de glucosilación unida a O. La glucosilación puede aumentar la semivida *in vivo* o alterar la actividad biológica. Las variantes de proteína BTNL9 también incluyen proteínas que comprenden uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez sitios de glucosilación N y/o O más que los que están presentes en la SEC ID N° 2 siempre que la proteína resultante pueda inhibir la proliferación de linfocitos T. Las variantes de proteína BTNL9 también incluyen las que tienen uno, dos, tres, cuatro, o cinco sitios de glucosilación unida a N y/o O menos que los que están presentes en la SEC ID N° 2 siempre que puedan inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3 o puedan inhibir la capacidad de que versiones sin mutar de la proteína BTNL9 lo hagan.

Las proteínas BTNL9 descritas en el presente documento, pueden ser proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido BTNL9, que puede comprender una secuencia de aminoácidos que es una variante y/o un fragmento de la SEC ID N° 2 (como se ha explicado anteriormente), y al menos otro resto. El otro resto puede ser un polipéptido distinto de una proteína BTNL9. El otro resto también puede ser un resto no proteico tal como por ejemplo, un resto de polietilenglicol (PEG) o un resto citotóxico, citostático, luminiscente, y/o radioactivo.

La adición de PEG ha demostrado que aumenta la semivida *in vivo* de al menos algunas proteínas. Además se han fusionado restos citotóxicos, citostáticos, luminiscentes, y/o radioactivos a anticuerpos con fines diagnósticos o terapéuticos, por ejemplo, para localizar, inhibir la proliferación de, o para destruir las células a las que se pueden

unir anticuerpos. De manera similar, las proteínas BTNL9 fusionadas a tales restos se pueden utilizar para localizar o inhibir la proliferación de, o para destruir células que se pueden unir a BTNL9, tal como los linfocitos B, linfocitos T y/u otras células implicadas en la respuesta inmunitaria. Entre tales restos citotóxicos, citostáticos, luminiscentes, y/o radioactivos están, por ejemplo, los derivados de la maitansina (tales como DMI), enterotoxinas tales como enterotoxina estafilocócica), isótopos de yodo (tal como yodo-125), isótopos de tecnecio (tales como Tc-99m), fluorocromos de cianina (tales como Cy5.5.18), proteínas inactivadoras de ribosomas (tales como bouganina, gelonina, o saporina-S6), y caliqueamicina, una sustancia citotóxica que es parte de un producto comercializado bajo la marca MYLOTARG™ (Wyeth-Ayerst).

Una variedad de polipéptidos distintos de BTNL9 se pueden fusionar a un polipéptido BTNL9 para una variedad de fines tales como, por ejemplo, aumentar la semivida *in vivo* de la proteína, facilitar la identificación, aislamiento y/o purificación de la proteína, aumentar la actividad de la proteína, y promocionar la oligomerización de la proteína.

Muchos polipéptidos pueden facilitar la identificación y/o la purificación de una proteína de fusión recombinante de la que son parte. Entre los ejemplos se incluyen poliarginina, polihistidina, o HAT™ (Clontech), que es una secuencia de origen natural de restos de histidina no adyacentes que posee una alta afinidad para iones metálicos inmovilizados. Las proteínas BTNL9 que comprenden estos polipéptidos se pueden purificar por ejemplo, por cromatografía de afinidad utilizando níquel o resina TALON™ (Clontech), que comprende iones de cobalto inmovilizados. Véase, por ejemplo, Knol y col. (1996); J. Biol. Chem. 27(26): 15358-15366. Los polipéptidos que comprenden poliarginina permiten una purificación eficaz por cromatografía de intercambio iónico. Otros polipéptidos útiles incluyen, por ejemplo, los péptidos de identificación antigénica que se describen en la Patente de EE. UU. 5.011.912 y en Hopp y col. (1988) Biol. Technology 6: 1204. Uno de tales péptidos es el péptido FLAG®, que es altamente antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, lo que permite un ensayo rápido y una purificación fácil de la proteína de fusión recombinante expresada. Un hibridoma murino denominado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se une al péptido FLAG® en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes, como se describe en la Patente de EE. UU. 5.011.912. La línea celular de hibridoma 4E11 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el N° de registro HB9259. Los anticuerpos monoclonales que se unen al péptido FLAG® se pueden utilizar como reactivos de afinidad para recuperar un reactivo de purificación de polipéptidos que comprende el péptido FLAG®. Otros marcadores proteicos adecuados y agentes de afinidad son: 1) los descritos en el sistema GST-Bind™ (Novagen), que utiliza la afinidad de las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa por el glutatión inmovilizado; 2) los que se describen en el kit de purificación por afinidad T7-TAG® (Novagen), que utiliza la afinidad de los 11 aminoácidos del extremo amino de la proteína 10 del gen T7 por un anticuerpo monoclonal; o 3) los que se describen en el sistema STREP-TAG® (Novagen), que utiliza la afinidad de una forma modificada de estreptavidina por un marcador proteico. Algunos de los marcadores proteicos mencionados anteriormente, así como otros, se describen en Sassenfeld (1990), TIBTECH 8: 88-93, Brewer y col., en *Purification and Analysis of Recombinant Proteins*, pp.239-266, Seetharam and Sharma (eds.), Marcel Dekker. Inc. (1991) y Brewer y Sassenfeld, en *Protein Purification Applications*, pp. 91-111. Harris and Angal (eds.), Press. Inc., Oxford Inglaterra (1990). Además, se pueden fusionar fusiones de dos o más de los marcadores descritos anteriormente, tal como por ejemplo, una fusión de un marcador FLAG y un marcador polihistidina, a una proteína BTNL9 de la invención.

Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos distintos de BTNL9 pueden tener otros tipos de ventajas únicas, tales como, por ejemplo, una tendencia a formar dímeros, trímeros o multímeros de mayor orden, un aumento de la semivida *in vivo*, y/o un aumento de la actividad biológica. Un "multímero de mayor orden" cuando se utiliza en conjunción, por ejemplo, con "dímero", significa un multímero que contiene más de dos cadenas de polipéptido. Cuando se utiliza en una frase como "un trímero o un multímero de mayor orden", el multímero de mayor orden contiene más de tres cadenas de polipéptido. Por lo tanto, un multímero de mayor orden es el que tiene más cadenas de polipéptido que el multímero con el que se compara. Las técnicas para preparar proteínas de fusión se conocen, y se describen, por ejemplo en la Solicitud Internacional WO 99/31241 y en Cosman y col. ((2001). Immunity 14: 123-133). Como ilustración, un polipéptido que comprende una región Fc de anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo IgG, o una proteína sustancialmente similar, se pueden fusionar a un polipéptido BTNL9 o un fragmento del mismo. Una región Fc de un anticuerpo es un polipéptido que comprende la mayoría o toda la bisagra más los dominios C_H2, y el C_H3 de un anticuerpo o dominios de inmunoglobulinas sustancialmente similares a estos. Para una revisión, véase Hasemann y Capra, Immunoglobulins: Structure and Function, en William E. Paul. ed., Fundamental Immunology. Segunda Edición. 212-213 (1989). El fragmento Fc puede ser un Fc de IgG humana, tal como Fc de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Un fragmento Fc puede ser un fragmento Fc nativo humano o animal. También se pueden utilizar formas trucadas de regiones Fc, es decir, formas que han perdido alguna parte de la bisagra, dominios C_H2, y/o C_H3, que promueven la dimerización. Se pueden utilizar otras porciones de anticuerpos y otros isotipos de inmunoglobulinas. Las proteínas de fusión recombinantes que comprenden regiones Fc de anticuerpos es probable que formen dímeros o multímeros de mayor orden. Las proteínas de fusión que comprenden varias partes de proteínas derivadas de anticuerpos han sido descritas por Ashkenazi y col. ((1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-39), Byrn y col. ((1990), Nature 344: 677-70), Hollenbaugh y Aruffo (en Current Protocols in Immunology, Supl. 4. pp. 10.19.1-10.19.11 (1992)). Baum y col. ((1994), EMBO J. 13: 3992-4001) y en la Patente de EE. UU. 5.457.035 y la Solicitud Internacional WO 93/10151. En algunas realizaciones, una región Fc alterada puede tener la ventaja de que tiene una afinidad baja por los receptores Fc en comparación con una región Fc de tipo silvestre. Esto puede ser una ventaja debido a que pueden disminuir la lisis de células a las que se unen

tales proteínas de fusión por células efectoras inmunitarias. Tales alteraciones de la región Fc se describen en la Patente de EE. UU. 5.457.035 y la Solicitud Internacional WO 93/10151. El Ejemplo 2 posterior describe la producción de una proteína de fusión que contiene la región extracelular de la BTNL9 humana y la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano.

Una proteína de fusión recombinante que comprende una proteína BTNL9 puede comprender un polipéptido que comprende una cremallera de leucina. Entre las secuencias conocidas de cremallera de leucina están las secuencias que promueven la dimerización y secuencias que promueven la trimerización. Véase por ejemplo, Landschulz y col. (1988), Science 240: 1759-64. Las cremalleras de leucina comprenden un intervalo repetitivo de siete que se repite, a menudo con cuatro o cinco restos de leucina intercalados con otros aminoácidos. El uso y preparación de las cremalleras de leucina se conocen bien en la técnica.

Una proteína BTNL9 de fusión puede comprender uno o más engarces peptídicos. En general, un engarce peptídico es un tramo de aminoácidos que sirve para unir pluralidades de péptidos para formar multímeros y proporcionar la flexibilidad o rigidez necesaria para la función deseada de las partes unidas de la proteína. Típicamente, un engarce peptídico tiene aproximadamente entre 1 y 30 aminoácidos de longitud. Ejemplos de engarces peptídicos incluyen, pero no se limitan a, --Gly-Gly--, GGGGS (SEC ID N° 9), (GGGGS)_n (SEC ID N° 10), GKSSGSGSESKS (SEC ID N° 11), GSTSGSGKSSEGKG (SEC ID N° 12), GSTSGSGKSSESGSGSTKG (SEC ID N° 13), GSTSGSGKSSEGKG (SEC ID N° 14), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEC ID N° 15), EGKSSGSGSESK (SEC ID N° 16) y GGGGSGGGGSGGGGS (SEC ID N° 17). Los restos de unión se describen, por ejemplo, en Huston, J. S., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879-83 (1988), Whitlow, M., y col., Protein Engineering 6: 989-95 (1993), Newton, D. L. y col., Biochemistry 35: 545-53 (1996), y las Patentes de EE. UU. 4.751.180 y 4.935.233.

Una proteína BTNL9 de fusión recombinante puede comprender una proteína BTNL9 que carece de su secuencia de señal normal y que tiene a su vez una secuencia de señal diferente que la reemplaza. La elección de la secuencia de señal depende del tipo de células huésped en las que se va a producir la proteína recombinante, y una secuencia de señal diferente puede reemplazar la secuencia de señal nativa. Ejemplos de secuencias de señal que son funcionales en células huésped de mamífero incluyen las siguientes: la secuencia de señal para la interleucina-7 (IL-7) que se describe en la Patente de EE. UU. 4.965.195; la secuencia de señal de la IgK humana (que es METDTLLLWVLLLWVPGSTG: SEC ID N° 3); la secuencia de señal del receptor de la interleucina-2 que se describe en Cosman y col. ((1984). Nature 312: 768); el péptido de señal del receptor de la interleucina-4 descrito en la Patente EP 0 367 566; el péptido de señal tipo I del receptor de la interleucina-1 que se describe en la Patente de EE. UU. 4.968.607; y el péptido de señal tipo II del receptor de la interleucina-1 que se describe en la Patente EP 0 460 846.

Ácidos nucleicos BTNL9

Se describen en el presente documento ácidos nucleicos aislados, que incluyen, por ejemplo, ADN y ARN, que codifican las proteínas BTNL9 descritas en el presente documento, que incluyen las proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 y fragmentos o variables de la misma. Estos ácidos nucleicos son útiles para, *inter alia*, la producción de proteínas recombinantes y la detección de la presencia de ácidos nucleicos BTNL9 en las muestras de tejido, por ejemplo, para usos diagnósticos. Tales ácidos nucleicos pueden ser ADN o ADNc. Los ácidos nucleicos pueden comprender una fase de lectura abierta ininterrumpida que codifica una proteína BTNL9. Las moléculas de ácido nucleico incluyen ADN y ARN tanto en forma de cadena sencilla como de doble cadena, así como las secuencias complementarias correspondientes. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del que se aísla el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes de origen natural. En el caso de los ácidos nucleicos sintetizados químicamente, tales como oligonucleótidos, o enzimáticamente a partir de una matriz, tal como los producidos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o ADNc, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislado se refiere a una molécula de ácido nucleico en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico más largo.

Además, se describen en el presente documento fragmentos de un ácido nucleico que codifica una proteína BTNL9 que sirve (1) como sondas para detectar ácidos nucleicos BTNL9 por varios procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, transferencia de Southern y Northern, transferencia de mancha, hibridaciones de colonia, hibridación con una matriz, etc., (2) como cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar ácidos nucleicos BTNL9, o (3) como un medio para regular la expresión de ácidos nucleicos BTNL9, por ejemplo, a través de la inhibición de la expresión con ácidos nucleicos antisentido (incluyendo ácidos nucleicos peptídicos), ribozimas, moléculas formadoras de triples hélices, o ARN de interferencia. Los ADN que codifican cualquiera de estos ARN también son ácidos nucleicos BTNL9 con el significado del presente documento. Los cebadores PCR pueden comprender, además de las secuencias de ácido nucleico BTNL9, otras secuencias tales como sitios de escisión de enzimas de restricción que facilitan el uso del ácido nucleico amplificado. La PCR se describe en las siguientes referencias Saiki y col. (1988), Science 239: 487-91; PCR Technology, Erlich, ed., Stockton Press, (1989). Como se explica posteriormente, la PCR puede ser útil para detectar la sobre-expresión o bajo-expresión de ARNm BTNL9, y los cebadores de la PCR se pueden tomar de varias partes del gen BTNL9 y también se pueden seleccionar para distinguir entre variantes empalmadas diferentes. Los ARN antisentido (y los

ADN que los codifican), los ADN, o los nucleótidos sintéticos y su uso para regular la expresión se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo Izant y Weintraub (1984), Cell 36(4): 1007-15; Izant y Weintraub (1985). Science 229(4711): 345-52; Harel-Bellan y col. (1988), J. Exp. Med. 168(6): 2309-18; Sarin y col. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(20): 7448-51; Zon (1988), Pharm. Res. 5(9): 539-49; Harel-Bellan y col. (1988), J. Immunol. 140(7): 2431-35; Marcus-Sekura y col. (1987), Nucleic Acids Res. 15(14): 5749-63; Gambati (2001), Curr. Pharm. Des. 7(17): 1839-62; y Lemaitre y col. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(3): 648-52. De manera similar, los ARN de interferencia (y los ADN que los codifican) y su uso para inhibir la expresión de genes seleccionados se conocen bien en la técnica y se describen por ejemplo, en Fjose y col. (2001), Biotechnol. Ann. Rev. 7: 31-57; Boshierand Labouesse (2000), Nature Cell Biol. 2: E31-E36. Además, se pueden dirigir ribozimas o ADNzimas para escindir ARN específicos y por lo tanto se utilizan para inhibir la expresión genética como se describe, por ejemplo, en Lewin y Hauswirth (2001), Trends Mol. Med. 7(5): 221 -28; Menke y Hobom (1997), Mol. Biotechnol. 8(1): 17-33; Norris y col. (2000). Adv. Exp. Med. Biol. 465: 293-301; Sioud (2001), Curr. Mol. Med. 1(5): 575-88; y Santiago y Khachigian (2001), J. Mol. Med. 79(12): 695-706. Los ácidos nucleicos que pueden regular la expresión de BTNL9 pueden ser útiles en estudios *in vivo* o *in vitro* de la función de BTNL9 o como agente terapéutico, opcionalmente, como agentes de terapia genética.

También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de la SEC ID N° 1 o un fragmento de la misma o ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas, y opcionalmente en condiciones altamente rigurosas, con ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1, que es la secuencia de nucleótidos de longitud completa del ADNc BTNL9, en que el ácido nucleico codifica una proteína que puede inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3. Las técnicas de hibridación se conocen bien en la técnica y se describen en Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capítulos 9 y 11, (1989)) y Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4 (1995)). Las condiciones moderadas de rigurosidad para filtrar la hibridación incluyen la hibridación en aproximadamente un 50% de formamida, 6 x SSC a una temperatura desde aproximadamente 42 °C a 55 °C y un lavado a aproximadamente 60 °C en 0,5 x SSC, 0,1% de SDS. Las condiciones altamente rigurosas se definen como las condiciones de hibridación anteriores, pero con el lavado a aproximadamente 68 °C en 0,2 x SSC, 0,1% SDS. Se puede sustituir con SSPE (1 x SSPE es 0,15 M de NaCl, 10 mM de NaH₂PO₄, y 1,26 mM de EDTA, pH 7,4) el SSC (1 x SSC es 0,15 M de NaCl y 15 mM de citrato sódico) en los tampones de hibridación y de lavado; se llevan a cabo los lavados, opcionalmente al menos dos lavados, durante 15 minutos después de completar la hibridación.

Se debe entender que la temperatura de lavado y la concentración en sales del lavado se puede ajustar como se necesite para conseguir un grado deseado de rigurosidad aplicando los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la estabilidad doble, como conocen los expertos en la técnica y se describe además posteriormente (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *supra*). Cuando los ácidos nucleicos de secuencia conocida se hibridan, la longitud del híbrido se puede determinar por alineamiento de las secuencias de los ácidos nucleicos (por ejemplo, utilizando GAP) e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima. La temperatura de hibridación para los híbridos que se anticipa que serán menores de 50 pares de bases de longitud, debería ser 5 a 10 °C menor que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para los híbridos menores de 18 pares de bases de longitud, T_m (grados C) = 2 (n° de bases A + T) + 4 (n° de bases G + C). Para los híbridos por encima de 18 pares de bases de longitud, T_m (grados C) = 81,5 + 16,6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0,41 (% G + C) – (600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na⁺] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación. Cada tal ácido nucleico de hibridación tiene una longitud que es al menos de 15 nucleótidos (o al menos de 18 nucleótidos, o al menos 20, o al menos 25, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 100). Sambrook y col., *supra*.

Los ácidos nucleicos BTNL9 incluyen ácidos nucleicos que comprenden los siguientes polinucleótidos: (1) toda o un fragmento de la SEC ID N° 1, en que el fragmento codifica una proteína BTNL9 que puede inhibir la proliferación de linfocitos T; (2) un polinucleótido que incluye secuencias de nucleótidos idénticas al menos en un 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,7% a la SEC ID N° 1, en que la ventana de alineamiento es al menos de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 400, 500, 600, 800, 900, 1000, o 1200 nucleótidos de longitud y en que la secuencia codifica una proteína BTNL9 que puede inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3; (3) fragmentos de la SEC ID N° 1 o secuencias sustancialmente similares que son útiles para la detección o amplificación de ácidos nucleicos que codifican las proteínas BTNL9 de la invención o para regular la expresión de ARNm y/o proteínas BTNL9; (4) un polinucleótido que comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, o 30 alteraciones de un único nucleótido con respecto a la SEC ID N° 1, en que la alteración puede ser una inserción, delección o sustitución de un único nucleótido, y en que el polinucleótido codifica una proteína BTNL9 que puede inhibir la proliferación de linfocitos T activados por un anticuerpo anti-CD3 o puede servir como un antagonista de tal proteína; y (5) un polinucleótido que codifica una proteína BTNL9 como se describe en el presente documento que incluye fragmentos, derivados y variantes de una proteína BTNL9 humana.

Procedimientos de fabricación de proteínas BTNL9

Las proteínas BTNL9 o los anticuerpos anti-BTNL9 (o anticuerpos anti-idiotípicos) se pueden fabricar de la siguiente manera. Un ácido nucleico que codifica una proteína BTNL9 o un anticuerpo anti-BTNL9, como se describen en el presente documento, se puede introducir en un vector, que se puede introducir en una célula huésped. Los vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican una proteína BTNL9 o un anticuerpo anti-BTNL9 también se describen en el presente documento. La célula huésped que contiene los ácidos nucleicos que codifican una proteína BTNL9 o un anticuerpo anti-BTNL9 se pueden cultivar bajo condiciones tales que se pueda expresar la proteína BTNL9 o el anticuerpo anti-BTNL9. La proteína BTNL9 o el anticuerpo anti-BTNL9 que se expresan se pueden obtener entonces del medio en que se cultivan las células o a partir de las células y se purifica por cualquiera de los muchos medios apropiados conocidos en la técnica. Además, los procedimientos de modificación genética para la producción de proteínas BTNL9 incluyen la expresión de las moléculas de polinucleótidos en sistemas de expresión libres de células, en células huésped, en tejidos, y en modelos animales, de acuerdo con procedimientos conocidos.

El vector puede incluir un marcador genético y un origen de replicación, para la propagación en el huésped. El vector puede incluir además secuencias reguladoras de la transcripción o la traducción, tales como las que se derivan de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos, unidas operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína BTNL9 o el anticuerpo anti-BTNL9. Ejemplos de tales secuencias reguladoras incluyen los promotores transcripcionales, operadores, o potenciadores, sitios de unión de ARNm al ribosoma, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y traducción. Las secuencias de nucleótidos están unidas operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con el ADN que codifica la proteína diana. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida operativamente a una secuencia nucleica BTNL9 si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia que codifica el anticuerpo anti-BTNL9 o la proteína BTNL9. Si la proteína BTNL9 es una proteína de fusión, una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la proteína de fusión, por ejemplo una secuencia de señal, puede ser parte de un vector, y un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-BTNL9 o proteína BTNL9, se puede insertar en el vector tal que una proteína que comprende la secuencia de señal añadida más el anticuerpo anti-BTNL9 o la proteína BTNL9 están codificadas por el vector.

Las células huésped adecuadas para la expresión de proteínas BTNL9 o anticuerpos anti-BTNL9 incluyen células procariotas, células de levaduras, células vegetales, células de insecto, y células eucariotas más grandes. Las secuencias reguladoras en el vector se escogerán tal que sean operativas en la célula huésped. Las células huésped procariotas adecuadas incluyen bacterias de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, y *Salmonella*, así como miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. Para la expresión en células procariotas, por ejemplo, en *E. coli*, la molécula de polinucleótido que codifica una proteína BTNL9 o un anticuerpo anti-BTNL9 incluye preferentemente un resto metionina en el extremo N para facilitar la expresión del polipéptido recombinante. La metionina del extremo N puede escindirse opcionalmente del polipéptido expresado. Las células huésped de levaduras adecuadas incluyen células de géneros que incluyen *Saccharomyces*, *Pichia*, y *Kluveromyces*. Las levaduras huéspedes preferidas son *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Un sistema adecuado de expresión en una célula huésped de insecto, se describe, por ejemplo, en la revisión de Luckow y Summers ((1988), *BioTechnology* 6: 47). Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (Gluzman y col. (1981), *Cell* 23: 175-182), células de crías de hámster (BHK), células de ovario de hámster chino (CHO) (Puck y col. (1958), *PNAS USA* 60: 1275-1281). CV-1 (Fischer y col. (1970), *Int. J. Cancer* 5: 21-27), células 293 de riñón humano (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®) nº de catálogo CRL-10852™), y células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA) (ATCC® CCL2).

Los vectores de expresión para su uso en los huéspedes celulares comprenden en general uno o más genes marcadores de selección fenotípica. Tales genes codifican, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que suministra una necesidad auxotrófica. Una amplia variedad de tales vectores están disponibles fácilmente en las fuentes comerciales. Ejemplos de los mismos incluyen los vectores pGEM (Promega), vectores pSPORT, y vectores pPROEX (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), vectores Bluescript (Stratagene), y vectores pQE (Qiagen). Los vectores de levaduras a menudo contendrán una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2 μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, y un gen marcador indicador. También se pueden utilizar vectores replicables tanto en levaduras como en *E. coli* (llamados vectores lanzadera). Además de las características mencionadas anteriormente de los vectores de levaduras, un vector lanzadera también incluirá secuencias para la replicación y selección en *E. coli*. La secreción directa de los polipéptidos diana que se expresan en levaduras huésped se puede conseguir por la inclusión de secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia directora del factor- α en el extremo 5' de la secuencia que codifica la BTNL9 o el anticuerpo. Brake (1989), *Biotechnology* 13: 269-280.

Ejemplos de vectores de expresión adecuados para su uso en células huésped de mamíferos incluyen pcADN3.1/Hygro (Invitrogen), pDC409 (McMahan y col. (1991), *EMBO J.* 10: 2821-2832), y pSVL. (Pharmacia Biotech). Los vectores de expresión para su uso en células huésped de mamífero pueden incluir secuencias de control transcripcional y traduccional derivadas de genomas víricos. Las secuencias promotoras que se utilizan habitualmente y las secuencias potenciadoras que se pueden utilizar para expresar el ARN BTNL9 incluyen, pero no

se limitan a, las derivadas de citomegalovirus humano (CMV), Adenovirus 2, virus del poliovirus, y virus 40 de simios (SV40). Los procedimientos para la construcción de vectores de expresión para mamíferos se desvelan por ejemplo en Okayama y Berg ((1982) Mol. Cell. Biol. 2:161-170), Cosman y col. ((1986) Mol. Immunol. 23:935-941), Cosman y col. ((1984) Nature 312: 768-771), documento EP-A-0367566, y documento WO 91/18982.

5 **Anticuerpos BTNL9**

Los anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas BTNL9 que se describen en el presente documento, anticuerpos idiotípicos que se unen a los anticuerpos anti-BTNL9, y los usos de estos anticuerpos se describen en el presente documento. Un anticuerpo anti-BTNL9 se puede unir a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2 o un fragmento de la misma tal como los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2. Como se utiliza en el presente documento, unión específica de un epítipo en una proteína BTNL9 con un primer anticuerpo significa que el primer anticuerpo puede ser desplazado de la proteína BTNL9 por otro anticuerpo que compite con el primer anticuerpo, pero no por otros anticuerpos anti-BTNL9 que no compiten por la unión con el primer anticuerpo. Se conocen numerosos ensayos de unión en la técnica.

Típicamente la competición de anticuerpos para la unión, se pueden evaluar por un ensayo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Todos los anticuerpos de interés estaban biotinilados. Los anticuerpos biotinilados se combinaban con células que se sabía que expresaban el antígeno al que se unían los anticuerpos. Si los anticuerpos biotinilados se unían a las células como se esperaba, se debería observar un cambio en la intensidad de fluorescencia. La pre-incubación de las células con una versión sin marcar del mismo anticuerpo debería eliminar completamente el cambio de fluorescencia que se observa. La pre-incubación con un anticuerpo sin marcar diferente puede eliminar parcial o completamente el cambio de fluorescencia o no tener efecto. En el último caso, se concluiría que el anticuerpo sin marcar no compite con el anticuerpo marcado. En el primer caso, los anticuerpos compiten por la unión, y, como significa en el presente documento, se concluiría que los epítopos se solapan o parcial o totalmente, dependiendo si la delección del cambio de fluorescencia era parcial o completo. Entre los anticuerpos están los que compiten, parcial o totalmente, con cualquier anticuerpo anti-BTNL9.

Además, el impacto de un anticuerpo BTNL9 en la activación de células T activadas anti-CD3 en presencia o ausencia de una proteína BTNL9 puede proporcionar una información adicional útil sobre las propiedades funcionales de un anticuerpo. También se describen en el presente documento anticuerpos monoclonales, que se unen cada uno a un epítipo particular de BTNL9, y anticuerpos monoclonales que compiten con estos por la unión.

Los epítopos en la proteína BTNL9 pueden comprender aminoácidos contiguos y también pueden comprender aminoácidos no contiguos que se ponen en proximidad por el plegamiento de una proteína BTNL9. Los epítopos se pueden identificar por métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de fragmentos proteicos o bibliotecas de péptidos, exploración de alanina, extracción de epítopos, escisión de epítopos, o cristalografía de rayos x. Véase por ejemplo, Leinonen y col. (2002), Clin. Chem. 48(12): 2208-16; Kroger y col. (2002), Biosens. Bioelectron. 17(11-12): 937-44; Zhu y col. (2001), Biochem. Biophys. Res. Commun. 282(4): 921-27; Obungti et al. (2009), Biochemistry 48: 7251-60.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales y se pueden producir por procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennel y col. (eds.), Plenum Press, New York (1980); y *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Kohler y Milstein (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 2197; Kozbor y col. (1984). J. Immunol. 133: 3001-3005 (que describe la técnica de hibridoma humano de linfocitos B); Cole y col., *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985) (que describe la técnica del hibridoma EBV); Kuby, Immunology, Segunda Edición, p. 162-64, W.H. Freeman and Co, New York (1994). También se describen en el presente documento las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos contra las proteínas BTNL9 de la invención. Tales líneas de hibridoma se pueden producir e identificar por técnicas convencionales. El hibridoma que produce un anticuerpo se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. Además, los anticuerpos anti-BTNL9 se pueden producir en otras células cultivadas, que incluyen, por ejemplo, las de ovario de hámster chino (CHO), HeLa, VERO, BHK, Cos, MDCK, 293, 3T3, mieloma (por ejemplo, NSO, NSI), o células W138, células de levaduras, células de insecto, y células bacterianas, que incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*. Tales anticuerpos se pueden producir introduciendo ácidos nucleicos que codifiquen los anticuerpos más ácidos nucleicos que hagan posible la expresión de estos ácidos nucleicos en las células huésped que se desee. Los anticuerpos se pueden entonces producir cultivando las células en las que se han introducido estos ácidos nucleicos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas, tales como, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

Los anticuerpos anti-BTNL9 pueden ser anticuerpos tetraméricos de longitud completa que comprenden dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, como los que se encuentran en la mayoría de especies de mamíferos. De manera alternativa, los anticuerpos anti-BTNL9 pueden ser anticuerpos de cadena sencilla que comprenden una región variable de cadena pesada y de cadena ligera y, opcionalmente, también uno o más dominios tipo región constante (Patente de EE. UU. 4.946.778; Bird y col. (1988), Science 242: 423-26; Huston y col. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83), anticuerpos diméricos o multivalentes (véase por ejemplo, Lantto y col. (2002), J. Gen.

Virol. 83: 2001-05; Hudson y Souriau (2001), Expert Opin. Biol. Ther. 1(5): 845-55), anticuerpos tetraméricos (véase por ejemplo, Janeway y col., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Quinta Edición, Parte II, Ch. 3, Garland Publishing (2001)), anticuerpos quiméricos (Hudson y Souriau, *supra*: Boulianne y col. (1984), Nature 312:643-46; Morrison y col. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-55; Takeda y col. (1985), Nature 314: 452-54; Neuberger y col. (1985), Nature 314: 268-70), anticuerpos humanos completos producidos en un mamífero transgénico no humano (descrito por ejemplo, en la Patente de EE. UU. 6.150.584) o por selección *in vitro* (Solicitud de Patente de EE. UU. 2002/0058033) o anticuerpos humanizados (Morrison y col., *supra*; Takeda y col., *supra*; Boulianne y col., *supra*). Además, los anticuerpos pueden estar "madurados" por esquemas de selección *in vitro* para la producción de un anticuerpo con propiedades alteradas tales como, por ejemplo, una afinidad más alta por el epítipo al que se une. Véase, por ejemplo, Jackson y col. (1995), J. Immunol. 154(7): 3310-19; Pini y Bracci (2000). Curr. Protein Pept. Sci. 1(2): 155-69; Ellmark y col. (2002), Mol. Immunol. 39(5-6): 349; O'Connell y col. (2002), J. Mol. Biol. 321(1): 49-56; Huls y col. (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50: 163-71; Hudson y Souriau, *supra*: Adams y Schier (1999), J. Immunol. Methods 231(1-2): 249-60; Schmitz y col. (2000), Placenta 21 Suppl. A: S106-12. De manera alternativa, los fragmentos de anticuerpo tales como, por ejemplo, los fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, o fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) que se pueden unir específicamente a la proteína BTNL9 de la invención también están englobados en lo que significa en el presente documento un anticuerpo anti-BTNL9. Véase, Kuby, *supra*, pp. 109-112 y Janeway y col., *supra*, para una exposición sobre los fragmentos Fab y Fv. También se describen en el presente documento anticuerpos anti-idiotípicos que se unen específicamente a proteínas BTNL9 y que imitan los efectos de las proteínas BTNL9. Tales anticuerpos idiotípicos se utilizan en los mismos usos que las proteínas BTNL9. Los procedimientos para generar anticuerpos anti-idiotípicos se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Kuby y col., *supra*, en 371-72. Se describen también varios tipos de anticuerpos biespecíficos recombinantes y no recombinantes que se pueden unir específicamente a la proteína BTNL9 de la invención y a otras proteínas. Varios tipos de anticuerpos biespecíficos y procedimientos para fabricarlos se describen por ejemplo en las Patentes de EE. UU. 4.474.893, 6.060.285, y 6.106.833.

Los anticuerpos anti-BTNL9 pueden ser anticuerpos multiméricos, incluidos los anticuerpos biespecíficos tetraméricos de longitud completa que contienen dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas o anticuerpos monovalentes multiméricos que contienen, por ejemplo, una cadena pesada más una cadena ligera más una región Fc. Tales anticuerpos multiméricos pueden contener ciertas mutaciones en su región Fc que facilita la formación de heterodímeros. Tales anticuerpos y mutaciones se describen en la Publicación de Patente Internacional N° Solicitud internacional WO 2009/089004 y la solicitud de EE. UU. 2007/0105199. Las regiones Fc en tales anticuerpos pueden tener secuencias nativas humanas o secuencias nativas de otras especies. De manera alternativa o además, las regiones Fc de tales anticuerpos pueden contener mutaciones en sus regiones Fc que o aumentan o disminuyen la función efectora aumentando o disminuyendo la afinidad de varios receptores Fc por la región Fc. Algunas de tales alteraciones de Fc se exponen en la Patente de EE. UU. N° 5.457.035 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/100151.

Un anticuerpo puede contener solo una única región variable de cadena pesada o ligera, opcionalmente fusionada con otra parte de un anticuerpo como se describe en la Solicitud de Patente de EE. UU. 2004/058820.

Algunos anticuerpos de origen natural, que se han encontrado en camellos y llamas, son dímeros que consisten en dos cadenas pesadas y no incluyen cadenas ligeras. Muldermans y col., 2001. *J. Biotechnol.* 74:277-302; Desmyter y col., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90. Los anticuerpos anti-BTNL9 que tienen esta estructura están entre los anticuerpos anti-BTNL9 que se describen en el presente documento.

Los anticuerpos anti-BTNL9 pueden tener una variedad de actividades y usos. Los anticuerpos anti-BTNL9 pueden ser anticuerpos antagonistas que bloquean o inhiben la función biológica de BTNL9, por ejemplo, bloqueando o antagonizando la inhibición dependiente de BTNL9 de la proliferación de linfocitos T, que se pueden ensayar por los procedimientos que se describen en los Ejemplos del presente documento. Los anticuerpos pueden ser también anticuerpos agonistas que se unen a la contraestructura BTNL9 e imitan la unión a BTNL9 para inhibir la activación o proliferación de linfocitos T. Tales anticuerpos agonistas también pueden ser anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a anticuerpos anti-BTNL9 y también se unen a la contraestructura BTNL9 e imitan la actividad de BTNL9, es decir, inhiben la proliferación de linfocitos T como se describe en el presente documento. Tales anticuerpos se pueden utilizar para los mismos usos que una proteína BTNL9. Los anticuerpos anti-BTNL9 pueden ser agonistas o antagonistas, por ejemplo, estabilizando o destruyendo la proteína BTNL9, posiblemente en combinación con otras proteínas, en la superficie celular. Por ejemplo, un anticuerpo agonista puede aumentar la actividad de BTNL9 estabilizando la forma transmembrana de BTNL9 o estabilizando la interacción de una proteína BTNL9 con otras proteínas BTNL9 o proteínas diferentes, en la superficie de, por ejemplo, linfocitos B u otros tipos celulares. Además, un anticuerpo antagonista puede inhibir la actividad BTNL9 desestabilizando la forma transmembrana de BTNL9, o desestabilizando las interacciones entre múltiples moléculas de BTNL9 o las interacciones de BTNL9 con otras proteínas, en la superficie celular, por ejemplo, de linfocitos B u otros tipos celulares. Los anticuerpos anti-BTNL9 agonistas se pueden unir también a las formas transmembrana de BTNL9, produciendo la transducción de una señal biológica en la célula en la que se expresa. Un anticuerpo anti-BTNL9 antagonista se puede utilizar para aumentar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto los anticuerpos anti-BTNL9 antagonistas se pueden utilizar por ejemplo en una vacuna para inducir una respuesta a un antígeno específico de un cáncer.

Los anticuerpos que se describen en el presente documento se pueden utilizar también en ensayos para detectar la presencia de proteínas BTNL9 de la invención, sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos se pueden utilizar también en la purificación de las proteínas BTNL9 de la invención por cromatografía de inmovilización de anticuerpos.

Agonistas y antagonistas de polipéptidos BTNL9

Además de anticuerpos agonistas o antagonistas, se describen en el presente documento otras moléculas relacionadas con anticuerpos que se unen específicamente a proteínas BTNL9, tales como los anticuerpos (Rönnmark y col. (2002), J. Immunol. Methods 261(1-2): 199-211) y los péptidos biológicamente activos que se describen en la Solicitud Internacional WO 00/24782 que se pueden unir específicamente a BTNL9 e inhibir la actividad biológica de las proteínas BTNL9. Además, los antagonistas BTNL9 incluyen los ácidos nucleicos descritos anteriormente que son útiles para modular la expresión de proteína BTNL9 y/o ARNm, tales como por ejemplo, ARN de interferencia (o el ADN que los codifica) o ARN o ADN antisentido.

Los antagonistas incluyen además proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos que se han seleccionado *in vitro* para unirse a la BTNL9 o su receptor y que pueden, opcionalmente, interferir en la interacción de BTNL9 y su receptor. De manera alternativa, tales proteínas pueden ser agonistas BTNL9 que promueven o imitan la función biológica de BTNL9. Las proteínas que se unen a BTNL9 o su receptor se pueden seleccionar por su capacidad para interferir la interacción de BTNL9 con su receptor, o, de manera alternativa, se puede diseñar una selección para obtener tales proteínas directamente.

Las proteínas se pueden seleccionar por varios procedimientos tales como, por ejemplo, fago de presentación o presentación de la superficie de una bacteria. Véase, por ejemplo, Parmley y Smith (1989), Adv. Exp. Med. Biol. 251: 215-218; Luzzagoy col. (1995), Biotechnol. Annu. Rev. 1: 149-83; Lu y col. (1995), Biotechnology (NY) 13(4): 366-372. En estos procedimientos, cada miembro de una biblioteca de dominios de unión se puede presentar en partículas de fago individuales o en células bacterianas, y se pueden seleccionar las bacterias o fagos que se unen a una proteína de interés bajo las condiciones elegidas. Los ácidos nucleicos que codifican los dominios de unión seleccionados se pueden obtener sombreado los fagos o bacterias seleccionados y aislando los ácidos nucleicos de ellos.

De manera alternativa, se puede seleccionar una proteína completamente *in vitro*. Por ejemplo, cada polipéptido individual en una biblioteca de dominios de unión potenciales se puede unir al ácido nucleico que le codifica, y se pueden seleccionar los que se unen a la proteína de interés bajo las condiciones elegidas. Como los polipéptidos están unidos a los ácidos nucleicos que los codifican, se facilitan las siguientes operaciones, tales como amplificación, clonación, o secuenciación de los ácidos nucleicos que codifican dominios de unión eficaces. Varios esquemas para tales selecciones se conocen en la técnica, incluyendo partículas ARNm-ribosoma-anticuerpo, ribosoma de presentación, fusiones covalentes péptido-ARN, o fusiones covalentes ADN-ARN-péptido. He y Taussig (1997), Nucleic Acids. Res. 25(24): 5132-5134; Hanes and Pluckthun (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 4937-4942; Roberts y Szostak (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12297-12302; Lohse y Wright (2001), Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 4(2): 198-204; Kurz y col. (2000), Nucleic Acids Res. 28(18): E83; Liu y col. (2000), Methods Enzymol. 318: 268-93; Nemoto y col. (1997), FEBS Lett. 414(2): 405-08; Patente de EE. UU. 6.261.804; Solicitudes Internacionales WO 00/32823; y WO 00/34784. Tales proteínas se pueden seleccionar para ser antagonistas o agonistas.

Usos terapéuticos

Se demuestra en el presente documento que una proteína de fusión BTNL9.Fc puede inhibir la proliferación de linfocitos T activados. BTNL9 también inhibe la producción de citoquinas, tales como IL-2, TNF α , IFN γ , e IL-17, por los linfocitos T activados. Además se ha demostrado por Clasificación celular activada por Fluorescencia (FACS) que la BTNL9 puede unirse a los linfocitos B y se puede unir con una fuerza limitada a los linfocitos T. Estos hallazgos indican que la BTNL9, o una molécula con la capacidad para agonizar la ruta de la BTNL9, puede ser útil como terapia para tratar enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias que están mediadas por los linfocitos T. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, y enfermedades fibróticas que incluyen la aterosclerosis, enfermedad obstructiva crónica (COPD), cirrosis, escleroderma, fibrosis del riñón trasplantado, y fibrosis pulmonar.

El hecho de que la BTNL9 ejerza sus efectos en los linfocitos T sin mostrar una unión robusta a los linfocitos T (como se muestra en los Ejemplos posteriormente) se puede explicar por más de una manera. Es posible que la interacción de BTNL9 con su contraestructura en la superficie de los linfocitos T pueda ser de baja afinidad o una interacción de unión transitoria. De manera alternativa, puede que la molécula BTNL9-Fc dimerica que los inventores han utilizado para ensayar la unión a los linfocitos T no sea el multímero correcto para unirse fuertemente a los linfocitos T.

Las moléculas que bloquean o inhiben la ruta BTNL9 pueden ser útiles en los cuadros oncológicos. Se puede utilizar un anticuerpo que se una a BTNL9 o su receptor y pueda bloquear o inhibir la interacción entre estas moléculas como una terapia para tratar el cáncer. También se podrían utilizar otros antagonistas de BTNL9 que se han descrito anteriormente. Algunos de los cánceres que se pueden tratar con un bloqueador de la ruta BTNL9 incluyen las

leucemias agudas o crónicas, linfomas, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemias linfocíticas, linfomas linfocíticos o cutáneos, carcinomas, sarcomas, timomas, neoplasias del mediastino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, varios tipos de cáncer de piel, cáncer de vejiga, gliomas malignos, cáncer de esófago, 5 cáncer de estómago, cáncer de páncreas, neoplasias hepatobiliarias, cáncer de intestino delgado, colon, o recto, cáncer de riñón o uréter, cáncer testicular, cáncer de la uretra o el pene, tumores ginecológicos, cáncer ovárico, sarcomas de los huesos, cánceres del sistema endocrino, melanoma cutáneo, melanoma intraocular, neoplasias del sistema nervioso central, y neoplasias de células plasmáticas, entre otros muchos cánceres.

Como se ha señalado anteriormente, un antagonista BTNL9 puede ser útil también como agente para fabricar una 10 vacuna más eficaz. Se podría utilizar BTNL9 con una vacuna para inducir una respuesta contra cualquier antígeno. Entre estos antígenos están los antígenos que se expresan altamente por las células cancerosas, tales como las células de los cánceres mencionados anteriormente. Entre estos antígenos cancerosos están las siguientes proteínas humanas: WT1, MUC1, LMP2, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE-A3, NY-ESO-1, PSMA, GM2/GD2 sintasa, CEA, MLANA/MART1, gp100, survivina, antígeno específico de próstata (PSA), transcriptasa inversa de telomerasa 15 (hTERT), puntos de ruptura de translocación del sarcoma, EPHA2, fosfatasa ácida prostática (PAP), inhibidor de apoptosis del melanoma (ML-IAP), α -fetoproteína (AFP), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), ERG, péptido NA17.A2 (VLPDVF1RC), paired box 3 (PAX3), quinasa de linfoma anaplásico (ALK), receptor androgénico, ciclina B1, ácido polisialílico, proteína RhoC de unión a GPT relacionado con rho, oncogén relacionado con la mielocitomatosis vírica v-myc (MYCN), TRP-2, gangliósido GD3, fucosil GM1, mesotelina, antígeno de células madre 20 de próstata (PSCA), MAGE-A1, CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, tetranectina (TN), ETV6-AML1 (especialmente los péptidos que incluyen el punto de ruptura). NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, proteína precursora sp32 de unión a la proacrosina (OY-TES-I), protein espermatocítica 17 (Sp17), LCK, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMWMAA, también conocido como proteoglicano condroitina sulfato de melanoma), AKAP-4, SSX2, XAGE-1, B7H3 (también conocido como CD276), legumina, TIE2, proteína del gen 4 25 asociada a próstata (PAGE-4), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), protamina 2 (también conocida como MAD-CT-I), glomulina (también conocida como FAP), PDGFR-p. SSX2, SSX5, antígeno I relacionado con Fos, CD20, integrina ctvp3, 5T4 antígeno oncofetal, CA IX, CDS, CD19, CD22 (también conocido como Siglec-2), CD30 (también conocido como TNFRSF1), CD33 (también conocido como Siglec-3), CD40, CD44V6, CD55, CD56 (también conocido como NCAM), CTLA-4 (también conocido como CD 152), EGFR, GD2, 30 HER2, HLA-DRII (MHC 11), IGF1R, IL-6, sialil Lewis Y, TAG-72, TAL6, TRAILR2, VEGF, CD52 (también conocido como CAMPATH-1), CD4, CD73, CA125 (también conocido como MUC16), CD66e, CD80 (también conocido como B7-1), PDGFR β , antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, también conocido como glutamato carboxipeptidasa 2, entre muchos otros nombres). Los antígenos de cáncer incluyen también la proteína LMP2 del virus del herpes 4 humano, las proteínas del papilomavirus E6 y E7, y la glucoceramida globo H (como se describe en Gilewski y col. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. 98(6): 3270-3275, la subunidad α 4 de las integrinas α 4 β 1 y α 4 β 7, la 35 integrina α 4 β 7, BAFF, APRIL, CD2, CD3, CD20, CD52, CD73, CD80, CD86, la proteína C₅ de complemento, IgE, IL-1 β , IL-5, IL-6R, IL-12, IL-23, y factor de necrosis tumoral α (TNF- α).

“**Tratamiento**” de cualquier enfermedad mencionada en el presente documento engloba todo alivio de al menos un 40 síntoma de la enfermedad, una reducción de la gravedad de la enfermedad, o el retraso o prevención de la progresión de la enfermedad hacia síntomas más graves que pueden, en algunos casos, acompañar o dar lugar al menos a otra enfermedad diferente. Tratamiento no significa necesariamente que la enfermedad vaya a curarse completamente. Un agente terapéutico útil solo necesita reducir la gravedad de una enfermedad, reducir la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o su tratamiento, o retraso en la aparición de síntomas más graves o una enfermedad más grave que se puede producir con alguna frecuencia después de la afección tratada. 45 Por ejemplo, si la enfermedad es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, un agente terapéutico puede reducir el número de sitios de inflamación distintos en el intestino, la extensión total del intestino afectado, reducir el dolor y/o la hinchazón, reducir síntomas tales como la diarrea, estreñimiento o vómitos, y/o la prevención de la perforación intestinal. Una afección del paciente puede evaluarse por técnicas de referencia tales como los rayos x después de un enema de bario o enteroclasia, endoscopia, colonoscopia, y/o una biopsia. Los procedimientos 50 adecuados varían de acuerdo con la afección del paciente y los síntomas.

Una “**cantidad terapéuticamente eficaz**” de un fármaco utilizado para tratar una enfermedad es una cantidad que reduce la gravedad de una enfermedad, reduce la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, o su tratamiento, o retrasa la aparición de síntomas más serios o una enfermedad más grave que puede producirse con alguna frecuencia después de tratar la afección.

La invención engloba una proteína BTNL9 multimérica soluble como se reivindica en el presente documento para su 55 uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, enfermedades fibróticas que incluyen aterosclerosis, cirrosis, escleroderma, lupus eritematoso sistémico, y fibrosis pulmonar. Tal tratamiento implica el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína BTNL9 multimérica soluble que se reivindica 60 en el presente documento, durante un tiempo suficiente para inducir una mejoría sostenida sobre la línea base de un indicador que refleja la gravedad de un trastorno particular o la gravedad de los síntomas producidos por el trastorno o retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad más grave que se produce a continuación de la afección

tratada en algunos o todos los casos. Los tratamientos de la invención se pueden utilizar antes, después o durante otros tratamientos para el trastorno en cuestión que se utilizan habitualmente, o se pueden utilizar sin otros tratamientos. Por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa se tratan habitualmente con sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, o corticosteroides. Estos tratamientos se pueden utilizar antes, durante o después de los

De manera similar, a menudo se trata el cáncer con agentes quimioterápicos y tales agentes se pueden utilizar junto con los agentes terapéuticos antagonistas de la BTNL9, tales como los anticuerpos anti-BTNL9, descritos en el presente documento. Los agentes quimioterápicos incluyen, por ejemplo, los siguientes agentes terapéuticos: agentes alquilantes (por ejemplo, busulfan, temozolomida, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), metil-lomustina, estreptozocina, cis-diamina di-cloroplatino, aziridinilbenzo-quinona, y tiotepa); iones inorgánicos (por ejemplo, cisplatino y carboplatino); mostazas nitrogenadas (por ejemplo, hidroclicloruro de melfalán, ifosfamida, clorambucilo, y HCl de mecloretamina); nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU)); antibióticos antineoplásicos (por ejemplo, adriamicina (doxorubicina), daunomicina, mitomicina C, daunorrubicina, idarrubicina, mitramicina, y bleomicina); derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel, vindesina, VP-16, y VM-26); antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato con o sin leucovorin, 5-fluorouracilo con o sin leucovorin, 5-fluorodesoxiuridina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxiformicina, gemcitabina, y fludarabina); podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, irinotecán, y topotecán); así como actinomicina D, dacarbazina (DTIC), mAMSA, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, L-asparaginasa, y mitoxantrona, entre muchos que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4ª Edición, DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993).

Para las afecciones autoinmunitarias o inflamatorias, se pueden retirar los linfocitos T de un paciente, por ejemplo, por medio de aféresis, y estimularlos ex vivo utilizando BTNL9, opcionalmente con otras proteínas, tal que los linfocitos T alcancen un fenotipo regulador o inhibidor. Los linfocitos T entonces pueden volverse a transferir al paciente. Para estimular los linfocitos T para que alcancen un fenotipo regulador o inhibidor, se pueden incubar en presencia de una superficie, por ejemplo, con perlas o en pocillos de placas microtiter, que estén revestidos de un anticuerpo humano anti-CD3 agonista de linfocitos T, rBTNL9.Fc o rB7-2.Fc en presencia de TGF-beta e IL-2. De manera alternativa, la superficie se podría revestir con una combinación de proteínas que incluye rBTNL9 o BTNL9.Fc más un anticuerpo anti-CD3 agonista o una combinación que incluye solo estas proteínas. En una realización, el anticuerpo anti-CD3 agonista, rBTNL9.Fc, y rB7-1.Fc o rB7-2.Fc pueden estar, por ejemplo, en una relación de peso de 2:10:2,5. El TGF-beta e IL-2 pueden estar a concentraciones adecuadas, tal como, por ejemplo, desde aproximadamente 0,05 a 5 ng/ml o aproximadamente 0,09 o 0,1 ng/ml para TGF-beta y desde aproximadamente 0,5 a 10 ng/ml o aproximadamente 10 ng/ml para la IL-2. Esto puede programar que los linfocitos T sean inhibidores o reguladores. Los linfocitos T se pueden incubar en tal grupo, por ejemplo, durante tres a siete días y luego recolectarse y suministrarse de nuevo al mismo paciente. De manera opcional, los linfocitos T se pueden incubar aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis o siete días. En algunas realizaciones, los linfocitos T se pueden dejar en reposo, es decir, cultivarse en presencia, por ejemplo, de IL-2, sin receptor de linfocitos T o estímulo co-estimulante, y luego se re-estimulan como se ha explicado anteriormente una o cuatro veces más. Las afecciones autoinmunes o inflamatorias tratables con tal régimen incluyen, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, sarcoidosis, y enfermedades fibróticas que incluyen arteriosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cirrosis, escleroderma, fibrosis del riñón trasplantado, y fibrosis pulmonar.

Cualquiera de los agentes terapéuticos descritos anteriormente se puede administrar en forma de una composición, es decir, con uno o más componentes adicionales tales como un vehículo fisiológicamente aceptable, excipiente o diluyente. Por ejemplo, una composición puede comprender una proteína BTNL9 soluble como se describe en el presente documento más un tampón, un antioxidante tal como el ácido ascórbico, un polipéptido de bajo peso molecular (tal como los que tienen menos de 10 aminoácidos), una proteína, aminoácidos, carbohidratos tales como la glucosa, sacarosa, o dextrinas, agentes quelantes tales como el EDTA, glutatión, y/u otros estabilizadores, excipientes y/o conservantes. La composición se puede formular como un líquido o liofilizado. Más ejemplos de los componentes que se pueden emplear en formulaciones farmacéuticas se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences. 16ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1980).

Las composiciones que comprenden las moléculas terapéuticas descritas anteriormente se pueden administrar por cualquier medio adecuado que incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, tópica, oral, nasal, vaginal, rectal, o pulmonar (por inhalación). Si se inyecta, la composición se puede administrar por vía intra-articular, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea por inyección en embolada o por infusión continua. Se contempla la administración local, es decir, en el sitio de la enfermedad, como son el suministro transdérmico y la liberación sostenida a partir de implantes, parches cutáneos, o supositorios. El suministro por inhalación incluye, por ejemplo, la inhalación nasal u oral, el uso de un nebulizador, inhalación en forma de aerosol, y similares. La administración por medio de un supositorio insertado en una cavidad corporal puede conseguirse, por ejemplo, insertando una forma sólida de la composición en una cavidad corporal escogida y permitiendo que se disuelva. Otras alternativas incluyen gotas oftalmológicas, preparaciones orales tales como píldoras, comprimidos para chupar, jarabes, y chicles, y preparaciones tópicas tales como lociones, geles, pulverizadores, y ungüentos. En la mayoría de los casos, las moléculas terapéuticas que son polipéptidos se pueden administrar por vía tópica o por inyección o inhalación.

Las moléculas descritas anteriormente se pueden administrar con cualquier dosificación, frecuencia y duración que pueda ser eficaz para tratar la afección que se va a tratar. La dosificación depende de la naturaleza molecular de la molécula terapéutica y de la naturaleza del trastorno que se va a tratar. El tratamiento puede continuarse tanto en cuanto sea necesario para conseguir los resultados deseados. La periodicidad del tratamiento puede ser constante o no durante la duración del tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede producirse inicialmente a intervalos semanales y después producirse semanas alternas. Los tratamientos que tienen una duración de días, semanas, meses, o años están englobados en la invención. El tratamiento se puede interrumpir y luego reiniciarse. Se pueden administrar dosis de mantenimiento tras el tratamiento inicial.

La dosificación se puede medir en miligramos por kilogramo de peso corporal (mg/kg) o como miligramos por metro cuadrado de superficie corporal (mg/m²) o como una dosis fija, independientemente de la altura o el peso. Estas son dosis de referencia en la técnica. La superficie del área corporal de una persona se calcula a partir de su altura y peso utilizando una fórmula de referencia. Por ejemplo, una proteína BTNL9 terapéutica o un anticuerpo que se une a la BTNL9 o su receptor se puede administrar a una dosis desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg. De manera alternativa, se puede administrar una dosis desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg. O se puede administrar una dosis de aproximadamente 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 100 mg, 200 mg, o 300 mg.

La invención se describe a continuación en referencia a ejemplos específicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de ARNm que codifica la proteína BTNL9 en células inmunitarias humanas y tejidos de adultos humanos.

Los siguientes experimentos se hicieron con el fin de reunir la información sobre la expresión de ARNm que codifica la BTNL9 humana en células inmunitarias humanas primarias y en varios tejidos.

Se aislaron las células inmunitarias primarias a partir de sangre entera o paquetes leucocitarios por medio de varios procedimientos de selección disponibles comercialmente en Stem Cell Sciences (Palo Alto, California) o Miltenyi Biotec (Alemania). Por ejemplo, se utilizó el kit de enriquecimiento de linfocitos T EASYSEP®, en combinación con el kit de enriquecimiento de linfocitos T CD4⁺ (ambos de Stem Cell Sciences), para aislar los linfocitos T CD4⁺, mientras que se aislaron los monocitos utilizando el kit de Aislamiento de Monocitos Miltenyi II. Tales separaciones celulares que utilizaban tales reactivos disponibles comercialmente son de uso rutinario en la técnica. Los macrófagos se obtuvieron por medio de maduración ex vivo de monocitos seleccionados negativamente durante siete días. Cada población celular aislada se analizó por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para determinar si la población celular aislada expresaba las proteínas de superficie que se esperaba. Se aisló el ARN y se evaluó por matriz Affymetrix (Affymetrix GENECHIP™ HG-UI333 Plus 2.0). La normalización de datos y el análisis de la detección de transcripción de BTNL9 humana se llevó a cabo utilizando el software ROSSETTA RESOLVER® (Rossetta Biosoftware, Cambridge, MA, EE. UU.). Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 2. Entre los distintos tipos celulares ensayados, las células que expresaban CD19 en sus superficies celulares (calle 6 en la Figura 2), es decir, los linfocitos B, expresaban las cantidades más altas de BTNL9.

La expresión de BTNL9 humana en tejidos de humanos adultos se evaluaron por análisis de micromatrices utilizando la matriz 2.0 Plus 133 de Genoma Humano Affymetrix GENECHIP™ (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3. Estos datos indicaban que la BTNL9 humana se expresa ampliamente en muchos tejidos diferentes. Entre los tejidos que muestran la expresión más alta de ARNm BTNL9 eran los de las siguientes estructuras fisiológicas: glándula adrenal (calle 1 de la Figura 3), colon (calle 9 de la Figura 3), corazón (calle 11 de la Figura 3), pulmón (calle 19 de la Figura 3), bazo (calle 26 de la Figura 3), timo (calle 28 de la Figura 3), y tejido adiposo blanco (calle 29 de la Figura 3).

Ejemplo 2: Preparación de BTNL9.Fc humana y BTNL2.Fc de ratón

A continuación se describe como se fabricó una proteína de fusión que contenía la región extracelular de la BTNL9 humana y la parte Fc de un anticuerpo IgG1 humano. Se construyó un ADNc en un vector apropiado que codificaba el dominio extracelular de una BTNL9 humana fusionado a un engarce más el fragmento Fc IgG1 humano. La SEC ID N° 18 proporciona la secuencia de este ADNc, y la SEC ID N° 19 proporciona la secuencia de aminoácidos de la proteína BTNL9.Fc codificada por este ADNc. Se transfectaron células CosPKB con la construcción de expresión en mamíferos BTNL9.Fc utilizando LIPOFECTAMINA™ 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un 0,5% de suero bajo en Ig. Estos procedimientos se describen en detalle en Ettehadih y col., OVEREXPRESSION OF PROTEIN KINASE B_A ENHANCES RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION IN TRANSIENT SYSTEMS en Animal Cell Technology: From Target to Market: Proceedings of the 17th ESACT Meeting. Tylösand, Suecia, 10-14 de Junio, 2001, Vol. 1. Lindner-Olsson y col., eds., pp. 31-35, Springer, 2001. Siete días después de la transfección, se recolectaron los sobrenadantes, y se purificó la proteína BTNL9.Fc por cromatografía en columna de Proteína A (columna MABSELECT™ SuRe, GE Healthcare).

Se fabricó una proteína BTNL2.Fc de ratón esencialmente como se describe en la Patente de EE. UU. 7.244.822, en la que esta construcción se llamó BTL-II:Fc. Esta proteína contiene la región extracelular de la proteína BTNL2 de ratón fusionada con una región Fc IgG1 humana. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína BTNL2.Fc de ratón y la secuencia de aminoácidos de la proteína BTNL2.Fc se exponen en las SEC ID N^{os} 20 y 21 de la Patente de EE. UU. 7.244.822, respectivamente.

Ejemplo 3: Análisis *in vitro* de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ murinos

El siguiente experimento se hizo para determinar los efectos de una proteína de fusión BTNL9.Fc humana sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ *in vitro*.

Se utilizó una suspensión celular simple de esplenocitos, que se había preparado a partir de bazo recogidos de al menos cinco hembras de ratón C57BL/6 por experimento, para purificar los linfocitos T CD4⁺ con el kit de selección negativa CD4⁺ para ratón EASYSEPTM (Stem Cell Sciences). La pureza de linfocitos T CD4⁺ era mayor del 90% según se evaluó por análisis FACS. Se revistieron las placas microtiter de cultivo tisular tratadas con concentraciones variables de un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (Clon 2C11, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Ca, EE. UU.) y 10 µg/ml de anticuerpo Fc anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) en PBS a 4 °C durante una noche. Los pocillos se lavaron entonces con PBS y se revistieron con la cantidad especificada de la proteína de fusión Fc indicada durante 4 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBS, y luego se añadieron 1-2 x 10⁵ esplenocitos CD4⁺ purificados/pocillo. Se determinó la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ por la incorporación de ³H-timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 6 horas de las 72 horas de cultivo. Se utilizó el fragmento Fc de una preparación de IgG humana como control negativo. Como controles positivos, se incluyeron también BTNL2.Fc de ratón, que se había demostrado previamente que inhibía la proliferación de linfocitos T, y B7-2-Fc humana (adquirida en R&D Biosystems), un potente co-estimulador conocido de linfocitos T.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Las calles 1 y 2 de la Figura 4 representan los ensayos de control negativo que contenían 10 µg/ml y 2 µg/ml, respectivamente del fragmento Fc de una preparación de IgG humana. La calle 3 muestra los resultados de un ensayo de control positivo que contenía una proteína B7-2-Fc humana. La calle 4 muestra los resultados de un ensayo que contenía la BTNL2.Fc de ratón, una molécula co-estimuladora negativa. Las calles 5 y 6 muestran los resultados de los ensayos que contenían los 10 µg/ml y 2 µg/ml de BTNL9.Fc humana, respectivamente. Estos datos confirman el efecto estimulante de la B7-2-Fc humana y el efecto inhibitorio de la BTNL2.Fc de ratón sobre la proliferación de linfocitos T de ratón e indica que la BTNL9.Fc humana puede inhibir la proliferación de linfocitos T.

Ejemplo 4: Análisis *in vitro* de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos

El siguiente experimento se hizo para determinar los efectos de una proteína de fusión BTNL9.Fc humana sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ humanos *in vitro*.

Los linfocitos T CD4⁺ humanos se purificaron de células mononucleares de sangre periférica humanas utilizando el kit II de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ humanos (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania, n^o de Catálogo 130-091-155), dando como resultado una población de células que contenía > 90% de células CD4⁺. Como en los ensayos de proliferación de CD4⁺ de ratón, las placas microtiter de cultivo tisular tratadas se pre-revistieron con concentraciones variables de mAb anti-CD3 (OKT3) y 10 µg/ml de Fc anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch) en PBS a 4 °C durante una noche. Los pocillos se lavaron entonces con PBS y se revistieron con la cantidad específica de la proteína de fusión Fc indicada durante 4 horas a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron entonces otra vez con PBS y luego se añadieron 1-2 x 10⁵ linfocitos T CD4⁺ humanos purificados/pocillo. Se determinó la proliferación de linfocitos CD4⁺ por la incorporación de ³H-timidina (1 µCi/pocillo) durante las últimas 6 horas de las 72 horas de cultivo. Se utilizó la proteína p7.5Fc como control negativo ya que no se une a las células CD4⁺ humanas y no tienen un efecto conocido en la proliferación de linfocitos T. Se incluyó la BTNL2.Fc de ratón como control positivo. Las células expuestas al anticuerpo anti-CD3 (OKT3) solo se incluyeron como un control positivo adicional.

Los resultados se muestran en la Figura 5. La calle 1 muestra los resultados de un ensayo que contenía el anticuerpo anti-CD3 y ninguna proteína adicional. Las calles 2 y 3 muestran los resultados de ensayos que contenían el anticuerpo anti-CD3 más la proteína de control negativo p7.5-Fc a concentraciones de 10 µg/ml y 2 µg/ml, respectivamente. Las calles 4-7 muestran los resultados de ensayos que contenían anticuerpo anti-CD3 más BTNL9.Fc humana a concentraciones de 20, 10, 5 y 2,5 µg/ml, respectivamente. La calle 8 muestra los resultados de un ensayo que contenía anticuerpo anti-CD3 y BTNL2.Fc de ratón a una concentración de 10 µg/ml. Estos datos muestran que la BTNL9.Fc humana inhibe la proliferación de linfocitos T humanos de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 5: Producción de citoquinas por los linfocitos T humanos activados

En un ensayo de proliferación anti-CD3 de referencia, como se ha descrito anteriormente, los linfocitos T CD4⁺ humanos se aislaron y estimularon con un anticuerpo anti-CD3, con o sin BTNL9.Fc (a una concentración que había

demostrado anteriormente que inhibía la proliferación de linfocitos T) o varias proteínas distintas que contienen Fc. Tras 72 horas de estimulación, se recolectaron 100 µl de sobrenadante de cada condición. Los sobrenadantes se ensayaron entonces en cuanto a los niveles de citoquinas utilizando un kit a medida disponible comercialmente para detectar simultáneamente múltiples citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, GM-CSF, TNF α , IFN γ e IL-1 β) vendido por Meso Scale Discovery de Gaithersburg, Maryland. Tales ensayos con kits son, en principio, similares a los ensayos ELISA, pero utilizan una tecnología de detección múltiple.

Las Figuras 6A-6E muestran los niveles de interleucina-2 (Figura 6A), factor de necrosis tumoral- α (Figura 6B), interferón- γ (Figura 6C), interleucina-17 (Figura 6D), e interleucina-13 (Figura 6E) que se detectaban. Las calles 1-7 de todos los paneles representan los resultados de los ensayos que contenían los siguientes ingredientes: (1), células sin anticuerpo anti-CD3 o cualquier proteína adicional; (2), células con el anticuerpo anti-CD3 solo; (3)-(5), células con anticuerpo anti-CD3 más una preparación de IgG, p7.5-Fc, o HB15-Fc, respectivamente; (6), células con anticuerpo anti-CD3 y BTNL2.Fc de ratón; y (7), células con anticuerpo anti-CD3 y BTNL9.Fc. Como la BTNL2.Fc de ratón, la BTNL9.Fc inhibía la expresión de interleucina-17, interleucina-2, factor de necrosis tumoral- α , e interferón- γ , pero no la interleucina-13, por los linfocitos T CD4⁺ en respuesta a la estimulación con un anticuerpo anti-CD3.

Ejemplo 6: Estudios de unión celular

Los siguientes experimentos se hicieron para determinar qué tipos celulares específicos de BTNL9 se le unen. Se generaron suspensiones celulares simples de esplenocitos de ratón y se activaron entonces con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (2C11-ratón; OKT3-humanos), concanavalina A (Con A), o lipopolisacáridos bacterianos (LPS) durante 48 horas. Se incluyeron también células no estimuladas como controles. Las células estimuladas y no estimuladas se tiñeron durante 60 minutos en hielo con huBTNL9.Fc o proteínas de control que contenían Fc. Después de un lavado, se detectó la unión de la proteína Fc con ficoeritrina (PE) conjugada con F(ab')₂ de cabra anti-Fc humano (Jackson ImmunoResearch) utilizando FACS. Además, estas células teñidas se co-teñieron con alofococianina (APC) conjugada con CD3 o CD19 (BD Biosciences) para identificar específicamente linfocitos T y linfocitos B, respectivamente, en las poblaciones celulares mezcladas. Las muestras se fijaron y analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCALIBUR™ (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EE. UU.).

Los datos resultantes indicaban que la BTNL9.Fc se une a los linfocitos B de ratón estimulados por LPS, pero no a los linfocitos B de ratón sin estimular. Datos no mostrados. Los demás datos indicaban que la BTNL9.Fc se une a linfocitos T estimulados solamente en un grado limitado y no se unían detectablemente a linfocitos T de ratón sin estimular. Esto puede indicar que la interacción de BTNL9 con linfocitos T es transitoria y/o de baja afinidad, por lo tanto por debajo del nivel de detección del ensayo FACS de los inventores.

Ejemplo 7: La inhibición de la proliferación de linfocitos T no se debe a muerte celular

El siguiente experimento se hizo para determinar si la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados por BTNL9.Fc se debía a muerte celular. Se utilizó un ensayo de detección de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) tras la estimulación de linfocitos T CD4⁺ humanos por un anticuerpo anti-CD3 en presencia o ausencia de BTNL9.Fc o proteínas de control para detectar citotoxicidad. La LDH es una enzima citoplasmática estable que se libera en el sobrenadante por el daño de la membrana plasmática y la muerte celular. La LDH se detectó por medio de una reacción colorimétrica tras 72 horas de estimulación según las instrucciones del fabricante (Kit de Detección de Citotoxicidad, Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE. UU.). Las células lisadas con Triton-X se utilizaron como control positivo por liberación máxima de LDH debido a muerte celular. Se utilizaron los mismos pocillos de ensayo experimentales para detectar la inhibición de la proliferación celular y la liberación de LDH.

Las Figuras 7A y 7B muestran los resultados de los ensayos de LDH y proliferación, respectivamente. La muestra representada en cada calle de las Figuras 7A y 7B se describe en detalle en la descripción resumida de estas figuras anteriormente. Estos datos indican que ni la BTNL2.Fc ni la BTNL9.Fc producen efectos citotóxicos a concentraciones que son suficientes para inhibir la proliferación de linfocitos T activados por anti-CD3. Por lo tanto, estos datos sugieren que la inhibición de la proliferación celular por estas proteínas no se acompaña de muerte celular.

Ejemplo 8: Expresión elevada de BTNL9 en tejido de colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal

El siguiente experimento se hizo con el fin de determinar si la BTNL9 está sobre-expresada o bajo-expresada en el tejido de colon de donantes con enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa) en comparación con el tejido de colon normal. Se midió la expresión de la BTNL9 humana por RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EE. UU.) en tejidos de colon de donantes sin enfermedad inflamatoria intestinal y de donantes con colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn. La cantidad de expresión de ARNm BTNL9 detectada se normalizó con la expresión de un gen constitutivo (β -actina). Para generar el ADNc, 20 ng de ARN total tratado con DNasa (libre de ADN, Ambion) de tejido enfermo o normal se transcribió inversamente utilizando el kit de transcripción inversa TAQMAN® (Applied Biosystems Inc.). Este ADNc se utilizó como matriz en la RT-PCR en tiempo real utilizando el Tampón Universal TAQMAN® (Applied Biosystems Inc.) y un grupo de sondas huBTNL9 (adquirido en Applied Biosystems; grupo de

sondas Hs_00537320-m1). Las condiciones PCR eran 50 °C durante 2 minutos, luego 95 °C durante 10 minutos, luego 40 ciclos con el siguiente régimen de temperaturas: 95 °C durante 15 segundos seguido por 60 °C durante 1 minuto. Cada reacción PCR se ejecutó por triplicado para cada muestra biológica incluida en el estudio.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Cada punto de la Figura 8 representa los datos de un donante. La expresión total de ARNm BTNL9 en el tejido de colon extirpado quirúrgicamente de los donantes con colitis ulcerativa (UC) o enfermedad de Crohn (Crohns) era mayor que en el tejido de colon de donantes sin enfermedad inflamatoria intestinal. La diferencia de expresión entre tejido normal y enfermo era estadísticamente significativa tanto para el tejido de UC como para Crohns. Estos datos indicaban que el ARNm BTNL9 se expresa a niveles más altos que los normales en los donantes con colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn, las dos enfermedades inflamatorias del intestino grueso más prevalentes. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la BTNL9 puede tener un papel en la mediación de una respuesta a estas enfermedades.

Ejemplo 9: Efectos del estado de agregación de BTNL9 sobre su inhibición de la proliferación de linfocitos T

El propósito de este experimento era determinar si el estado de agregación de BTNL9.Fc tiene un papel en su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T. Se obtuvieron fracciones purificadas de BTNL9.Fc en varios estados de agregación de la siguiente manera. La BTNL9.Fc, que se había obtenido de un sobrenadante del cultivo de células de mamífero que la expresaban, se purificó por cromatografía de proteína A. Más específicamente, se cargó la BTNL9.Fc en una columna de Proteína A en 25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,4. La columna se lavó con 25 mM de Tris, 0,5 M de L-arginina, pH 7,5 seguido por 25 mM de Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4. Se eluyó la proteína BTNL9.Fc con 50 mM de citrato sódico, 1 M de L-arginina, pH 3,5 y se tituló a pH neutro con 1 M de Tris, pH 8,0. La BTNL9.Fc se purificó además por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) que se llevó a cabo en 154 mM de NaCl, 3,89 mM de KH₂PO₄, 12 mM Na₂HPO₄, pH 7,2 (PBS). Cada fracción individual se analizó por SEC analítica y luego se agruparon juntas de manera conservadora en tres fracciones. Las fracciones agrupadas se concentraron y formularon en PBS con 50 µM de EDTA y se analizaron por SEC analítica, los resultados se muestran en la Figura 9.

La fracción agrupada I mostraba un único pico en la SEC analítica que tenía un peso molecular de aproximadamente 958.000 daltons. Por lo tanto la fracción I contenía casi completamente especies altamente agregadas. La fracción agrupada 2 contenía una mezcla 50:50 aproximadamente de moléculas de dos clases de tamaño, mostrando dos picos principales en la SEC analítica que tenían pesos moleculares de aproximadamente 903.000 daltons y 531.000 daltons. Por lo tanto, la fracción 2 contenía una mezcla de especies altamente agregadas y especies agregadas de tamaño moderado. Más del 80% de la fracción 3 consistía en especies más pequeñas. El pico principal en la SEC de la fracción 3 tenía un peso molecular aparente de aproximadamente 197.000 daltons. Estas especies pueden ser un dímero o como mucho un trímero, mientras que el tamaño de la BTNL9.Fc según se determinó con un gel de poliacrilamida procesado bajo condiciones reductoras es aproximadamente de 65.000 daltons. Datos no mostrados. Este tamaño corresponde más o menos al peso molecular esperado para un monómero BTNL9.Fc con alguna glucosilación. Las especies de aproximadamente 531.000 daltons de la fracción 2 puede contener octámeros ya que es aproximadamente 8 veces el tamaño del monómero. Las especies de más de 900.000 daltons presentes en las fracciones 2 y 3 son multímeros de mayor orden, posiblemente 14meros.

Estas fracciones purificadas de BTNL9.Fc se utilizaron en ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺, realizada como se ha descrito anteriormente. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 10 (linfocitos T de ratón) y 11 (linfocitos T humanos). Los resultados muestran que las fracciones 1 y 2 de BTNL9.Fc mostraban una inhibición estadísticamente significativa (con respecto a los controles) de la proliferación de linfocitos tanto humanos como de ratón. La fracción 1 era de alguna manera menos eficaz en ambos ensayos que la fracción 2, aunque la significación estadística de esta diferencia no se determinó. Por otro lado, la fracción 3 de la BTNL9.Fc no mostraba inhibición de la proliferación de linfocitos T tanto humanos como de ratón. Por lo tanto, estos datos indican que los agregados de mayor orden son más eficaces en la inhibición de la proliferación de linfocitos T que las especies menores tales como dímeros o trímeros. Basándose en la identificación provisional de las especies principales de la fracción 3 como un dímero, estos datos indican que al menos se necesita un trímero para que la BTNL9.Fc inhiba la proliferación de linfocitos T, aunque puede ser necesario un multímero de mayor orden tal como al menos un tetrámero o un pentámero. Otra forma de revisar estos datos es que una especie de al menos ocho veces el peso molecular de una especie monomérica de una proteína BTNL9 puede inhibir eficazmente la proliferación de linfocitos T, mientras que una especie que es aproximadamente tres veces el peso molecular de una especie monomérica de la proteína BTNL9 no puede.

Ejemplo 10: Localización de BTNL9 en el endotelio capilar del bazo

El siguiente experimento se hizo para determinar si la BTNL9 se expresaba en el tejido vascular del bazo. Se fijó el tejido esplénico humano congelado utilizando un 75% de acetona/25% de etanol y se tiñó en combinación con anticuerpos específicos para la BTNL9 humana y CD31 humano. El CD31 se expresa preferencialmente en el endotelio vascular. Tras la incubación y lavado, se añadieron los anticuerpos secundarios al tejido para la detección por medio de inmunofluorescencia. Tras el lavado final, se tiñeron las secciones con DAPI y se exploraron por imagen. La co-localización de la tinción de BTNL9 y CD31 demuestra la expresión de BTNL9 en el endotelio capilar del bazo. El bazo también contiene células BTNL9⁺/CD31⁺ teñidas más débilmente. Por tanto, estos resultados

indican que se expresa BTNL9 en tejido tanto vascular como no vascular del bazo.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> AMGEN INC. Arnett, Heather A. Escobar, Sabine S. Swanson, Ryan M. Viney, Joanne L.	
10	<120> PROTEÍNAS, ÁCIDOS NUCLEICOS, Y ANTICUERPOS BTNL9 Y USOS DE LOS MISMOS <130> A-1568-WO-PCT	
15	<140> --A asignar-- <141> 08-04-2011 <150> 61/322.800 <151> 09-04-2010	
20	<160> 21 <170> PatentIn Versión 3.5	
25	<210> 1 <211> 3520 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<220> <221> CDS <222> (232)..(1836) <400> 1	
	agagcaaacg gcatatatct tagggtggaa gatggataaa taattctgtc acacgtgcc	60
	tggcctctgg agctcagctg ccagtcacag tctagggaa cttagcatct gggaccaaga	120
	cactttacag caatcatcac cctttgcaga ggaggtgagc tcaccaggac tcatctgcca	180
	tttcagacct tttgctgcta cctgccaggt ggccccact gctgacgaga g atg gtg	237
	Met Val	
	1	
	gac ctc tca gtc tcc cca gac tcc ttg aag cca gta tgg ctg acc agc	285
	Asp Leu Ser Val Ser Pro Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu Thr Ser	
	5 10 15	
	agt ctt gtc ttc ctc atg cac ctc ctc ctc ctt cag cct ggg gag ccg	333
	Ser Leu Val Phe Leu Met His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro	
	20 25 30	
	agc tca gag gtc aag gtg cta ggc cct gag tat ccc atc ctg gcc ctc	381
	Ser Ser Glu Val Lys Val Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu Ala Leu	
	35 40 45 50	
	gtc ggg gag gag gtg gag ttc ccg tgc cac cta tgg cca cag ctg gat	429
	Val Gly Glu Glu Val Glu Phe Pro Cys His Leu Trp Pro Gln Leu Asp	
	55 60 65	
	gcc cag caa atg gag atc cgc tgg ttc cgg agt cag acc ttc aat gtg	477
	Ala Gln Gln Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ser Gln Thr Phe Asn Val	
	70 75 80	
35	gta cac ctg tac cag gag cag cag gag ctc cct ggc agg cag atg ccg	525
	Val His Leu Tyr Gln Glu Gln Gln Glu Leu Pro Gly Arg Gln Met Pro	

85	90	95	
gcg ttc cgg aac agg acc aag ttg gtc aag gac gac atc gcc tat ggc Ala Phe Arg Asn Arg Thr Lys Leu Val Lys Asp Asp Ile Ala Tyr Gly 100 105 110			573
agc gtg gtc ctg cag ctt cac agc atc atc ccc tct gac aag ggc aca Ser Val Val Leu Gln Leu His Ser Ile Ile Pro Ser Asp Lys Gly Thr 115 120 125 130			621
tat ggc tgc cgc ttc cac tcc gac aac ttc tct ggc gaa gct ctc tgg Tyr Gly Cys Arg Phe His Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala Leu Trp 135 140 145			669
gaa ctg gag gta gca ggg ctg ggc tca gac cct cac ctc tcc ctt gag Glu Leu Glu Val Ala Gly Leu Gly Ser Ser Asp Pro His Leu Ser Leu Glu 150 155 160			717
ggc ttc aag gaa gga ggc att cag ctg agg ctc aga tcc agt ggc tgg Gly Phe Lys Glu Gly Gly Ile Gln Leu Arg Leu Arg Ser Ser Gly Trp 165 170 175			765
tac ccc aag cct aag gtt cag tgg aga gac cac cag gga cag tgc ctg Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Asp His Gln Gly Gln Cys Leu 180 185 190			813
cct cca gag ttt gaa gcc atc gtc tgg gat gcc cag gac ctg ttc agt Pro Pro Glu Phe Glu Ala Ile Val Trp Asp Ala Gln Asp Leu Phe Ser 195 200 205 210			861
ctg gaa aca tct gtg gtt gtc cga gcg gga gcc ctc agc aat gtg tcc Leu Glu Thr Ser Val Val Val Arg Ala Gly Ala Leu Ser Asn Val Ser 215 220 225			909
gtc tcc atc cag aat ctc ctc ttg agc cag aag aaa gag ttg gtg gtc Val Ser Ile Gln Asn Leu Leu Leu Ser Gln Lys Lys Glu Leu Val Val 230 235 240			957
cag ata gca gac gtg ttc gta ccc gga gcc tct gcg tgg aag agc gcg Gln Ile Ala Asp Val Phe Val Pro Gly Ala Ser Ala Trp Lys Ser Ala 245 250 255			1005
ttc gtc gcg acc ctg ccg ctg ctg ttg gtc ctc gcg gcg ctg gcg ctg Phe Val Ala Thr Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Leu Ala Leu 260 265 270			1053
ggc gtc ctc cgg aag cag cgg aga agc cga gaa aag ctg agg aag cag Gly Val Leu Arg Lys Gln Arg Arg Ser Arg Glu Lys Leu Arg Lys Gln 275 280 285 290			1101
gcg gag aag aga caa gag aaa ctc act gca gag ctg gaa aag ctt cag Ala Glu Lys Arg Gln Glu Lys Leu Thr Ala Glu Leu Glu Lys Leu Gln 295 300 305			1149
aca gag ctt gac tgg aga cgg gct gaa ggc cag gct gag tgg aga gca Thr Glu Leu Asp Trp Arg Arg Ala Glu Gly Gln Ala Glu Trp Arg Ala 310 315 320			1197
gcc caa aaa tat gca gtg gat gtg acg ctg gac ccg gcc tcg gcg cac Ala Gln Lys Tyr Ala Val Asp Val Thr Leu Asp Pro Ala Ser Ala His 325 330 335			1245
ccc agc ctg gag gtg tcg gag gat ggc aag agc gtg tct tcc cgc ggg Pro Ser Leu Glu Val Ser Glu Asp Gly Lys Ser Val Ser Ser Arg Gly 340 345 350			1293

gcg ccg cca ggc ccg gcg cct ggc cac ccg cag cgg ttc tcg gag cag Ala Pro Pro Gly Pro Ala Pro Gly His Pro Gln Arg Phe Ser Glu Gln 355 360 365 370	1341
acg tgc gcg ctg agc ctg gag cgg ttc tcc gcc ggc cgc cac tac tgg Thr Cys Ala Leu Ser Leu Glu Arg Phe Ser Ala Gly Arg His Tyr Trp 375 380 385	1389
gag gtg cac gtg ggc cgc cgc agc cgc tgg ttc ctg ggc gcc tgc ctg Glu Val His Val Gly Arg Arg Ser Arg Trp Phe Leu Gly Ala Cys Leu 390 395 400	1437
gcc gcg gtg ccg cgc gcg ggg cct gcg cgc ctg agc cct gcg gcc gcc Ala Ala Val Pro Arg Ala Gly Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ala Ala Gly 405 410 415	1485
tac tgg gtg ctg ggg ctg tgg aac ggc tgc gag tac ttc gtc ctg gcc Tyr Trp Val Leu Gly Leu Trp Asn Gly Cys Glu Tyr Phe Val Leu Ala 420 425 430	1533
ccg cac cgc gtc gcg ctc acc ctg cgc gtg ccc ccg cgg cgc ctg gcc Pro His Arg Val Ala Leu Thr Leu Arg Val Pro Pro Arg Arg Leu Gly 435 440 445 450	1581
gtc ttc ctg gac tac gag gcc gga gag ctg tcc ttc ttc aac gtg tcc Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Glu Leu Ser Phe Phe Asn Val Ser 455 460 465	1629
gac gcc tcc cac atc ttc acc ttc cac gac acc ttc tcg ggc gcg ctc Asp Gly Ser His Ile Phe Thr Phe His Asp Thr Phe Ser Gly Ala Leu 470 475 480	1677
tgt gcg tac ttc agg ccc agg gcc cac gac gcc gcc gaa cat ccg gat Cys Ala Tyr Phe Arg Pro Arg Ala His Asp Gly Gly Glu His Pro Asp 485 490 495	1725
ccc ctg acc atc tgc ccg ctg ccg gtt aga ggg acg gcc gtc ccc gaa Pro Leu Thr Ile Cys Pro Leu Pro Val Arg Gly Thr Gly Val Pro Glu 500 505 510	1773
gag aac gac agt gac acc tgg cta cag ccc tat gag ccc gcg gac ccc Glu Asn Asp Ser Asp Thr Trp Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Ala Asp Pro 515 520 525 530	1821
gcc ctg gac tgg tgg tgaggcgccc tegtggccgc gggactggcc ccggggggcc Ala Leu Asp Trp Trp 535	1876
ccctggatcc caggccagcg ctttgctctc ctgctccgtc tgaagggagc aggtgcacca	1936
gccaaaatgt cagcgagggg gacaaagaga gggacctttg cctacgtaga tgtgtatgtg	1996
tagtgcgatt ttcttcaagg aaaggagaca agtccaaagc tcgtttgtgg attgtgggac	2056
tgagcgaagg agtacaata tatccacgtc gctcagagct ggggtgctca cgggtggcgg	2116
tgggcaagaa gccagcatgg aagaaagaag ggagaaaact ttggtgactg ccttagaggg	2176
atcagttaat ttgtatagtt ttatatTTTT tgtatatgtt tgctagctct aaaaaggctg	2236
agatgcaata acacttcgta agcaacgagt tcacctaagt aaggctcaga tctagtttt	2296
aaaaaccatt tccattaaa atgaagttgg aggaacagct gcttctggag ccgggggcaa	2356

aatttcaagg tgagcctgga gcattgtgtg tgggtgaagta aaataaaggc tcaaaacgtg	2416
acggcaaccc ggcaaaaggg tagggagcca ggccgaaggg gcctcaactga ccaattgtgg	2476
gacaatttga acatcaggat gaataatgac aggagagatt ataacacact gaataaaaac	2536
ataatccatg agttcatgct gatactcaaa tttcttttta aaaaggagaa acaggaaggt	2596
ttcttttggg ggtgaaatct aattattggt gagagtcttg gagaacaggc tgtttccagt	2656
ctcaaagcag taaccttata cactacttat aagtttgaaa ggggaaagggt tacctttaca	2716
atggagacat ctaccagatc atccaagtga tttaaatttaa catcatcaat gatgggacca	2776
aggacattat tagtttgaca actggggaaa gaagtgttct tcacccccta cccccaagac	2836
attgtctctg tcggccaggc tggagtgcag cctcaacctc ctgggtccaa gtgatcctcc	2896
cacctcagca cacaacacca tgcccaattt taagtgcgtt atagagacgg ggggtctcact	2956
ttgttaccba ggctgggtctc aaactcctgc gctcaagcaa tcctcccacc tgggcctccc	3016
aaaatgctgg gtgtacaggc atgagccgct gtgcctggct tcattttcag agtgagacat	3076
ttgtactgtg gctatgtagg agaacattct tgttcttagc aaacatactg aagtttttag	3136
atattaatta ccacagtgtc tgccactgaa tttccagtga ctaagtggaa aaatataaaa	3196
catatgaata taaagaaaga aagagacaag tcaaagttag taaaatgaca acacttgggtg	3256
actctagggtg actgggtcgac agatgttcat tgtactatca atgtggcttt gctgtgggtt	3316
tgaaattttg caaactaaga gttgggtggc ggggagaagg atacacccaa aaactaagtg	3376
attatctttg gatgggaaaa tgtttggtaa ttgcattctt aaaatgtctt ctttgtattt	3436
tttaatgttc aataatgtat atgtatcagt tctgtaataa aggggaaaac acttttttta	3496
aataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	3520

<210> 2
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Val Asp Leu Ser Val Ser Pro Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Val Phe Leu Met His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly
20 25 30

Glu Pro Ser Ser Glu Val Lys Val Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu
35 40 45

Ala Leu Val Gly Glu Glu Val Glu Phe Pro Cys His Leu Trp Pro Gln
50 55 60

Leu Asp Ala Gln Gln Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ser Gln Thr Phe

65		70		75		80
Asn Val Val His Leu Tyr Gln Glu Gln Gln Glu Leu Pro Gly Arg Gln		85		90		95
Met Pro Ala Phe Arg Asn Arg Thr Lys Leu Val Lys Asp Asp Ile Ala		100		105		110
Tyr Gly Ser Val Val Leu Gln Leu His Ser Ile Ile Pro Ser Asp Lys		115		120		125
Gly Thr Tyr Gly Cys Arg Phe His Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala		130		135		140
Leu Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly Leu Gly Ser Asp Pro His Leu Ser		145		150		155
Leu Glu Gly Phe Lys Glu Gly Gly Ile Gln Leu Arg Leu Arg Ser Ser		165		170		175
Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Asp His Gln Gly Gln		180		185		190
Cys Leu Pro Pro Glu Phe Glu Ala Ile Val Trp Asp Ala Gln Asp Leu		195		200		205
Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Val Val Arg Ala Gly Ala Leu Ser Asn		210		215		220
Val Ser Val Ser Ile Gln Asn Leu Leu Leu Ser Gln Lys Lys Glu Leu		225		230		235
Val Val Gln Ile Ala Asp Val Phe Val Pro Gly Ala Ser Ala Trp Lys		245		250		255
Ser Ala Phe Val Ala Thr Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Leu		260		265		270
Ala Leu Gly Val Leu Arg Lys Gln Arg Arg Ser Arg Glu Lys Leu Arg		275		280		285
Lys Gln Ala Glu Lys Arg Gln Glu Lys Leu Thr Ala Glu Leu Glu Lys		290		295		300
Leu Gln Thr Glu Leu Asp Trp Arg Arg Ala Glu Gly Gln Ala Glu Trp		305		310		315
Arg Ala Ala Gln Lys Tyr Ala Val Asp Val Thr Leu Asp Pro Ala Ser		325		330		335

Ala His Pro Ser Leu Glu Val Ser Glu Asp Gly Lys Ser Val Ser Ser
340 345 350

Arg Gly Ala Pro Pro Gly Pro Ala Pro Gly His Pro Gln Arg Phe Ser
355 360 365

Glu Gln Thr Cys Ala Leu Ser Leu Glu Arg Phe Ser Ala Gly Arg His
370 375 380

Tyr Trp Glu Val His Val Gly Arg Arg Ser Arg Trp Phe Leu Gly Ala
385 390 395 400

Cys Leu Ala Ala Val Pro Arg Ala Gly Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ala
405 410 415

Ala Gly Tyr Trp Val Leu Gly Leu Trp Asn Gly Cys Glu Tyr Phe Val
420 425 430

Leu Ala Pro His Arg Val Ala Leu Thr Leu Arg Val Pro Pro Arg Arg
435 440 445

Leu Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Glu Leu Ser Phe Phe Asn
450 455 460

Val Ser Asp Gly Ser His Ile Phe Thr Phe His Asp Thr Phe Ser Gly
465 470 475 480

Ala Leu Cys Ala Tyr Phe Arg Pro Arg Ala His Asp Gly Gly Glu His
485 490 495

Pro Asp Pro Leu Thr Ile Cys Pro Leu Pro Val Arg Gly Thr Gly Val
500 505 510

Pro Glu Glu Asn Asp Ser Asp Thr Trp Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Ala
515 520 525

Asp Pro Ala Leu Asp Trp Trp
530 535

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 4
<211> 26
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 5
<211> 2463
<212> ADN
<213> *Mus sp*

<220>
<221> CDS
<222> (124)..(1731)

<400> 5

```

agcttagcat cagggactaa catttcacaa tcaccccctt tagagggagg tgagattgcc      60
agcatccctc taccgcttgg atcttcttct gttacctgaa aggtggggccc tcaccgctga      120
cag atg gca gat ttc tca gta ttt ctg ggg ttt ctg aag caa ata cct      168
  Met Ala Asp Phe Ser Val Phe Leu Gly Phe Leu Lys Gln Ile Pro
    1          5          10          15
cgg tgc ctc agc atc ttc ttc acc tac ctt ctc ttc ctt cag ttg tgg      216
Arg Cys Leu Ser Ile Phe Phe Thr Tyr Leu Leu Phe Leu Gln Leu Trp
          20          25          30
gag gtg aac tca gac aag gtc tgg gtg ttg ggc cct gag gag tcc att      264
Glu Val Asn Ser Asp Lys Val Trp Val Leu Gly Pro Glu Glu Ser Ile
          35          40          45
ttg gcc cgc gtc ggg gaa gcg gtg gag ttc cca tgt cgc tta tca tca      312
Leu Ala Arg Val Gly Glu Ala Val Glu Phe Pro Cys Arg Leu Ser Ser
          50          55          60
tac caa gac gca gag cac atg gaa att cgc tgg ttt cgg gcc cag gtc      360
Tyr Gln Asp Ala Glu His Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ala Gln Val
          65          70          75
tcc aac gtg gtg tac ctg tac cag gag ccg cag ggg cgc tcc agc ctg      408
Ser Asn Val Val Tyr Leu Tyr Gln Glu Pro Gln Gly Arg Ser Ser Leu
          80          85          90          95
cag atg gca cag ttc cga aac agg acc tta ttt gaa gcc tat gac att      456
Gln Met Ala Gln Phe Arg Asn Arg Thr Leu Phe Glu Ala Tyr Asp Ile
          100          105          110
gca gag gga agc gtg aac cta cac atc ctt aaa gtg ctt ccc tcc gac      504
Ala Glu Gly Ser Val Asn Leu His Ile Leu Lys Val Leu Pro Ser Asp
          115          120          125

```

gag ggc cga tat ggg tgc cgc ttt ctt tct gac aac ttc tct ggt gaa Glu Gly Arg Tyr Gly Cys Arg Phe Leu Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu 130 135 140	552
gcc acg tgg gag ctg gaa gta gca gga tcg ggc tca gac cca cac atc Ala Thr Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly Ser Gly Ser Asp Pro His Ile 145 150 155	600
tcc ctc cag ggc ttc agt gga gaa ggt att cag ctg cag tgc agt tcc Ser Leu Gln Gly Phe Ser Gly Glu Gly Ile Gln Leu Gln Cys Ser Ser 160 165 170 175	648
agt ggc tgg tac ccc aag cca aag gtt cag tgg aga ggt cac cag ggt Ser Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Gly His Gln Gly 180 185 190	696
cag tgc ctt tct cca gag tct gaa gcc atc acc cag aat gcc caa ggc Gln Cys Leu Ser Pro Glu Ser Glu Ala Ile Thr Gln Asn Ala Gln Gly 195 200 205	744
ctg ttc agt ctg gag aca tcc gtg att gtc cga gga gga gcc cat agc Leu Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Ile Val Arg Gly Gly Ala His Ser 210 215 220	792
aat gtg tct tgt ata atc cag aac ccc ttg ctg ccc cag aag aaa gaa Asn Val Ser Cys Ile Ile Gln Asn Pro Leu Leu Pro Gln Lys Lys Glu 225 230 235	840
ttc gtg atc cag att gca gat gtg ttc cta ccc aga atg tcc ccc tgg Phe Val Ile Gln Ile Ala Asp Val Phe Leu Pro Arg Met Ser Pro Trp 240 245 250 255	888
aag aaa gcg ttt gtg gga acc ctg gtg gtc ctg ccg ctc agt ctg att Lys Lys Ala Phe Val Gly Thr Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Leu Ile 260 265 270	936
gtg ctc acc atg ctg gcg ctg cga tat ttt tac aag ctg cgg agc ttc Val Leu Thr Met Leu Ala Leu Arg Tyr Phe Tyr Lys Leu Arg Ser Phe 275 280 285	984
caa gaa aaa cag gtg aag cag gga gag gag gtc cga gag aaa ctt cag Gln Glu Lys Gln Val Lys Gln Gly Glu Glu Val Arg Glu Lys Leu Gln 290 295 300	1032
aca gag ctt gac tgg aga agg tct gaa ggc cag gct gag tgg aga gca Thr Glu Leu Asp Trp Arg Arg Ser Glu Gly Gln Ala Glu Trp Arg Ala 305 310 315	1080
gcc cag caa tat gca gcg gat gtg acc ttg gat cct gcc aca gcg cac Ala Gln Gln Tyr Ala Ala Asp Val Thr Leu Asp Pro Ala Thr Ala His 320 325 330 335	1128
cct agc ctg gag gtc tcc aac aac ggc aag acc gtg tcc tcc cgc ctg Pro Ser Leu Glu Val Ser Asn Asn Gly Lys Thr Val Ser Ser Arg Leu 340 345 350	1176
ggg gtg ccc agt att gca gct ggg gac ccg cag cgg ttc tcg gag cag Gly Val Pro Ser Ile Ala Ala Gly Asp Pro Gln Arg Phe Ser Glu Gln 355 360 365	1224
acc tgc gtg ctg agc cgg gag cgc ttc tcc agc ggc cgc cac tac tgg Thr Cys Val Leu Ser Arg Glu Arg Phe Ser Ser Gly Arg His Tyr Trp 370 375 380	1272

gag gtg cac gtg ggc cgg cgc agc cgc tgg ttc ctg ggc gcc tgt ctg Glu Val His Val Gly Arg Arg Ser Arg Trp Phe Leu Gly Ala Cys Leu 385 390 395	1320
gag tcg gtg gag cgc tcc ggg ccc gcg cgc ctg agc ccg gcg gct ggc Glu Ser Val Glu Arg Ser Gly Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ala Ala Gly 400 405 410 415	1368
tac tgg gtg atg ggg ctg tgg aac cgc tgc gag tac ttc gtg ctg gac Tyr Trp Val Met Gly Leu Trp Asn Arg Cys Glu Tyr Phe Val Leu Asp 420 425 430	1416
ccg cat cgc gtg gca ctg gcg cta cgc gtg cct ccc cgg agg ata ggc Pro His Arg Val Ala Leu Ala Leu Arg Val Pro Pro Arg Arg Ile Gly 435 440 445	1464
gtc ctg ttg gac tac gag gcc ggg aag ctg tct ttc ttc aac gtg tct Val Leu Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Lys Leu Ser Phe Phe Asn Val Ser 450 455 460	1512
gat ggc tcg cac atc ttc agc ttc acc gac act ttc tca ggg gcg ctc Asp Gly Ser His Ile Phe Ser Phe Thr Asp Thr Phe Ser Gly Ala Leu 465 470 475	1560
cgc gcc tac tta agg ccc cga gct cac gac ggc agt gaa cat ccg gat Arg Ala Tyr Leu Arg Pro Arg Ala His Asp Gly Ser Glu His Pro Asp 480 485 490 495	1608
cct atg acc atc tgc tct ttg ccg gtt aga ggg cca cag gtc ctc gaa Pro Met Thr Ile Cys Ser Leu Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Leu Glu 500 505 510	1656
gag aac gac aac gac aac tgg cta cag ccc tat gag cct ctg gac ccc Glu Asn Asp Asn Asp Asn Trp Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Leu Asp Pro 515 520 525	1704
gcc tgg gct gtt aat gag gca gtg tcc tgacctcaag gccaggtcca Ala Trp Ala Val Asn Glu Ala Val Ser 530 535	1751
agcactgtcc tgaactcctg gacagcgctt tgctctcctg cagccaaagc agagtcagca	1811
gaaagaggac agagagagag ggcctataca gatgaatgta tataattatc tttaaacaga	1871
caaatgaaag attgtttgtg tatatagcag gattctggag tgtgcagtgt agaagatggg	1931
aaagaatcat aattatccgc taatgtgtgt atagttctgt atagtgtata tgtgtgtgtg	1991
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtaattttg tggatcctgc aaaagtctag aagtaatgtc	2051
atttcataag caatgagttc acctttggct cagaatacag tttatagcga cttccttgat	2111
catgtatgtg gcaattcgaa catgaaattc aataatggca gtgatgtggc tggctggggg	2171
taagcagtgg tagagtgctt gcctagcccg agggatagca cacatcttca acttcactgc	2231
cgatttcccc agaaaagtgc attggatccc ccgctcaggt ggagcaggat aaggatggca	2291
ggaatgcagc gatactccta aaacataaac atacatataa gtaacattta caaacagaaa	2351
aggctatatt tagcaaaata taagtatata catatactca tctaatatca ttaattttaa	2411
aagccatgat tttgaaagag agctagaagt gaggcataagg agaatttgag gg	2463

<210> 6
<211> 536
<212> PRT

<213> *Mus sp*

<400> 6

Met Ala Asp Phe Ser Val Phe Leu Gly Phe Leu Lys Gln Ile Pro Arg
1 5 10 15

Cys Leu Ser Ile Phe Phe Thr Tyr Leu Leu Phe Leu Gln Leu Trp Glu
20 25 30

Val Asn Ser Asp Lys Val Trp Val Leu Gly Pro Glu Glu Ser Ile Leu
35 40 45

Ala Arg Val Gly Glu Ala Val Glu Phe Pro Cys Arg Leu Ser Ser Tyr
50 55 60

Gln Asp Ala Glu His Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ala Gln Val Ser
65 70 75 80

Asn Val Val Tyr Leu Tyr Gln Glu Pro Gln Gly Arg Ser Ser Leu Gln
85 90 95

Met Ala Gln Phe Arg Asn Arg Thr Leu Phe Glu Ala Tyr Asp Ile Ala
100 105 110

Glu Gly Ser Val Asn Leu His Ile Leu Lys Val Leu Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gly Arg Tyr Gly Cys Arg Phe Leu Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala
130 135 140

Thr Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly Ser Gly Ser Asp Pro His Ile Ser
145 150 155 160

Leu Gln Gly Phe Ser Gly Glu Gly Ile Gln Leu Gln Cys Ser Ser Ser
165 170 175

Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Gly His Gln Gly Gln
180 185 190

Cys Leu Ser Pro Glu Ser Glu Ala Ile Thr Gln Asn Ala Gln Gly Leu
195 200 205

Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Ile Val Arg Gly Gly Ala His Ser Asn
210 215 220

Val Ser Cys Ile Ile Gln Asn Pro Leu Leu Pro Gln Lys Lys Glu Phe
225 230 235 240

Val Ile Gln Ile Ala Asp Val Phe Leu Pro Arg Met Ser Pro Trp Lys
 245 250 255
 Lys Ala Phe Val Gly Thr Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Leu Ile Val
 260 265 270
 Leu Thr Met Leu Ala Leu Arg Tyr Phe Tyr Lys Leu Arg Ser Phe Gln
 275 280 285
 Glu Lys Gln Val Lys Gln Gly Glu Glu Val Arg Glu Lys Leu Gln Thr
 290 295 300
 Glu Leu Asp Trp Arg Arg Ser Glu Gly Gln Ala Glu Trp Arg Ala Ala
 305 310 315 320
 Gln Gln Tyr Ala Ala Asp Val Thr Leu Asp Pro Ala Thr Ala His Pro
 325 330 335
 Ser Leu Glu Val Ser Asn Asn Gly Lys Thr Val Ser Ser Arg Leu Gly
 340 345 350
 Val Pro Ser Ile Ala Ala Gly Asp Pro Gln Arg Phe Ser Glu Gln Thr
 355 360 365
 Cys Val Leu Ser Arg Glu Arg Phe Ser Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu
 370 375 380
 Val His Val Gly Arg Arg Ser Arg Trp Phe Leu Gly Ala Cys Leu Glu
 385 390 395 400
 Ser Val Glu Arg Ser Gly Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ala Ala Gly Tyr
 405 410 415
 Trp Val Met Gly Leu Trp Asn Arg Cys Glu Tyr Phe Val Leu Asp Pro
 420 425 430
 His Arg Val Ala Leu Ala Leu Arg Val Pro Pro Arg Arg Ile Gly Val
 435 440 445
 Leu Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Lys Leu Ser Phe Phe Asn Val Ser Asp
 450 455 460
 Gly Ser His Ile Phe Ser Phe Thr Asp Thr Phe Ser Gly Ala Leu Arg
 465 470 475 480
 Ala Tyr Leu Arg Pro Arg Ala His Asp Gly Ser Glu His Pro Asp Pro
 485 490 495

Met Thr Ile Cys Ser Leu Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Leu Glu Glu
500 505 510

Asn Asp Asn Asp Asn Trp Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Leu Asp Pro Ala
515 520 525

Trp Ala Val Asn Glu Ala Val Ser
530 535

<210> 7
<211> 1505
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (91)..(1122)

<400> 7

ctttgcagag gaggtgagct caccaggact catctgccat ttcagacctt ttgctgctac	60
ctgccagggtg gccccactg ctgacgagag atg gtg gac ctc tca gtc tcc oca Met Val Asp Leu Ser Val Ser Pro 1 5	114
gac tcc ttg aag cca gta tgg ctg acc agc agt ctt gtc ttc ctc atg Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu Thr Ser Ser Leu Val Phe Leu Met 10 15 20	162
cac ctc ctc ctc ctt cag cct ggg gag ccg agc tca gag gtc aag gtg His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro Ser Ser Glu Val Lys Val 25 30 35 40	210
cta ggc cct gag tat ccc atc ctg gcc ctc gtc ggg gag gag gtg gag Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu Ala Leu Val Gly Glu Glu Val Glu 45 50 55	258
ttc ccg tgc cac cta tgg cca cag ctg gat gcc cag caa atg gag atc Phe Pro Cys His Leu Trp Pro Gln Leu Asp Ala Gln Gln Met Glu Ile 60 65 70	306
cgc tgg ttc cgg agt cag acc ttc aat gtg gta cac ctg tac cag gag Arg Trp Phe Arg Ser Gln Thr Phe Asn Val Val His Leu Tyr Gln Glu 75 80 85	354
cag cag gag ctc cct ggc agg cag atg ccg gcg ttc cgg aac agg acc Gln Gln Glu Leu Pro Gly Arg Gln Met Pro Ala Phe Arg Asn Arg Thr 90 95 100	402
aag ttg gtc aag gac gac atc gcc tat ggc agc gtg gtc ctg cag ctt Lys Leu Val Lys Asp Asp Ile Ala Tyr Gly Ser Val Val Leu Gln Leu 105 110 115 120	450
cac agc atc atc ccc tot gac aag ggc aca tat ggc tgc cgc ttc cac His Ser Ile Ile Pro Ser Asp Lys Gly Thr Tyr Gly Cys Arg Phe His 125 130 135	498
tcc gac aac ttc tct ggc gaa gct ctc tgg gaa ctg gag gta gca ggg Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala Leu Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly 140 145 150	546

ctg ggc tca gac cct cac ctc tcc ctt gag ggc ttc aag gaa gga ggc Leu Gly Ser Asp Pro His Leu Ser Leu Glu Gly Phe Lys Glu Gly Gly 155 160 165	594
att cag ctg agg ctc aga tcc agt ggc tgg tac ccc aag cct aag gtt Ile Gln Leu Arg Leu Arg Ser Ser Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val 170 175 180	642
cag tgg aga gac cac cag gga cag tgc ctg cct cca gag ttt gaa gcc Gln Trp Arg Asp His Gln Gly Gln Cys Leu Pro Pro Glu Phe Glu Ala 185 190 195 200	690
atc gtc tgg gat gcc cag gac ctg ttc agt ctg gaa aca tct gtg gtt Ile Val Trp Asp Ala Gln Asp Leu Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Val 205 210 215	738
gtc cga gcg gga gcc ctc agc aat gtg tcc gtc tcc atc cag aat ctc Val Arg Ala Gly Ala Leu Ser Asn Val Ser Val Ser Ile Gln Asn Leu 220 225 230	786
ctc ttg agc cag aag aaa gag ttg gtg gtc cag ata gca gac gtg ttc Leu Leu Ser Gln Lys Lys Glu Leu Val Val Gln Ile Ala Asp Val Phe 235 240 245	834
gta ccc gga gcc tct gcg tgg aag agc gcg ttc gtc gcg acc ctg ccg Val Pro Gly Ala Ser Ala Trp Lys Ser Ala Phe Val Ala Thr Leu Pro 250 255 260	882
ctg ctg ttg gtc ctc gcg gcg ctg gcg ctg ggc gtc ctc cgg aag cag Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Leu Ala Leu Gly Val Leu Arg Lys Gln 265 270 275 280	930
cgg aga agc cga gaa aag ctg agg aag cag gcg gag aag aga caa gag Arg Arg Ser Arg Glu Lys Leu Arg Lys Gln Ala Glu Lys Arg Gln Glu 285 290 295	978
aaa ctc act gca gag ctg gaa aag ctt cag aca gag ctt gac tgg aga Lys Leu Thr Ala Glu Leu Glu Lys Leu Gln Thr Glu Leu Asp Trp Arg 300 305 310	1026
cgg gct gaa ggc cag gct gag tgc ttc gtt tta gcc agc cac cct cct Arg Ala Glu Gly Gln Ala Glu Cys Phe Val Leu Ala Ser His Pro Pro 315 320 325	1074
gga gaa ggt atc cag gct gcc tct aac tcc aca aca aca ctg aat gca Gly Glu Gly Ile Gln Ala Ala Ser Asn Ser Thr Thr Thr Leu Asn Ala 330 335 340	1122
tagtctcaaa cgtgttgccct tacggcgctg tgtggagatt tctctgggggt ttgcaacctc	1182
tgaatgctga gaagattgag catctctgta tatgctagtt ggctctgggg acttctctcta	1242
ctgaaaattg ccagctcaca tcaactgacc atttttctta tgggatggct gtcttttatt	1302
attaacagga atattatata tctgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgag	1362
attaatccct catgggtaaa catcgtgaat tccttcttct gttgtgccat ctgccattag	1422
ctttgtccat agttccctt attgaaaagg aattattaat tttgataaaa cataatccat	1482
caaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa	1505

<210> 8
<211> 344
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

Met Val Asp Leu Ser Val Ser Pro Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu
1          5          10          15

Thr Ser Ser Leu Val Phe Leu Met His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly
20          25          30

Glu Pro Ser Ser Glu Val Lys Val Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu
35          40          45

Ala Leu Val Gly Glu Glu Val Glu Phe Pro Cys His Leu Trp Pro Gln
50          55          60

Leu Asp Ala Gln Gln Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ser Gln Thr Phe
65          70          75          80

Asn Val Val His Leu Tyr Gln Glu Gln Gln Glu Leu Pro Gly Arg Gln
85          90          95

Met Pro Ala Phe Arg Asn Arg Thr Lys Leu Val Lys Asp Asp Ile Ala
100         105         110

Tyr Gly Ser Val Val Leu Gln Leu His Ser Ile Ile Pro Ser Asp Lys
115         120         125

Gly Thr Tyr Gly Cys Arg Phe His Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala
130         135         140

Leu Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly Leu Gly Ser Asp Pro His Leu Ser
145         150         155         160

Leu Glu Gly Phe Lys Glu Gly Gly Ile Gln Leu Arg Leu Arg Ser Ser
165         170         175

Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Asp His Gln Gly Gln
180         185         190

Cys Leu Pro Pro Glu Phe Glu Ala Ile Val Trp Asp Ala Gln Asp Leu
195         200         205

Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Val Val Arg Ala Gly Ala Leu Ser Asn
210         215         220

Val Ser Val Ser Ile Gln Asn Leu Leu Leu Ser Gln Lys Lys Glu Leu
225         230         235         240

```

Val Val Gln Ile Ala Asp Val Phe Val Pro Gly Ala Ser Ala Trp Lys
245 250 255

Ser Ala Phe Val Ala Thr Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Leu
260 265 270

Ala Leu Gly Val Leu Arg Lys Gln Arg Arg Ser Arg Glu Lys Leu Arg
275 280 285

Lys Gln Ala Glu Lys Arg Gln Glu Lys Leu Thr Ala Glu Leu Glu Lys
290 295 300

Leu Gln Thr Glu Leu Asp Trp Arg Arg Ala Glu Gly Gln Ala Glu Cys
305 310 315 320

Phe Val Leu Ala Ser His Pro Pro Gly Glu Gly Ile Gln Ala Ala Ser
325 330 335

Asn Ser Thr Thr Thr Leu Asn Ala
340

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Engarce
<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Engarce
<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Asn
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Engarce

<400> 11

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

5
 <210> 12
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Engarce
 <400> 12

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

15
 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Engarce
 <400> 13

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

25
 <210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Engarce
 <400> 14

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

40
 <210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> Engarce
 <400> 15

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

50
Lys Gly
 <210> 16

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Engarce

<400> 16

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
 1 5 10

10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Engarce

20

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

25

<210> 18
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de fusión

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1500)

35

<400> 18

atg gtg gac ctc tca gtc tcc cca gac tcc ttg aag cca gta tcg ctg 48
 Met Val Asp Leu Ser Val Ser Pro Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15

acc agc agt ctt gtc ttc ctc atg cac ctc ctc ctc ctt cag cct ggg 96
 Thr Ser Ser Leu Val Phe Leu Met His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly
 20 25 30

gag ccg agc tca gag gtc aag gtg cta ggc cct gag tat ccc atc ctg 144
 Glu Pro Ser Ser Glu Val Lys Val Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu
 35 40 45

gcc ctc gtc ggg gag gag gtg gag ttc ccg tgc cac cta tgg cca cag 192
 Ala Leu Val Gly Glu Glu Val Glu Phe Pro Cys His Leu Trp Pro Gln
 50 55 60

ctg gat gcc cag caa atg gag atc cgc tgg ttc cgg agt cag acc ttc 240
 Leu Asp Ala Gln Gln Met Glu Ile Arg Trp Phe Arg Ser Gln Thr Phe

65	70								75				80								
aat gtg gta cac ctg tac cag gag cag cag gag ctc cct ggc agg cag	Asn Val Val His	Leu Tyr Gln Glu Gln Gln Glu Leu Pro Gly Arg Gln	288																		
	85		90		95																
atg ccg gcg ttc cgg aac agg acc aag ttg gtc aag gac gac atc gcc	Met Pro Ala Phe Arg Asn Arg Thr Lys Leu Val Lys Asp Asp Ile Ala	336																			
	100		105		110																
tat ggc agc gtg gtc ctg cag ctt cac agc atc atc ccc tct gac aag	Tyr Gly Ser Val Val Leu Gln Leu His Ser Ile Ile Pro Ser Asp Lys	384																			
	115		120		125																
ggc aca tat ggc tgc cgc ttc cac tcc gac aac ttc tct ggc gaa gct	Gly Thr Tyr Gly Cys Arg Phe His Ser Asp Asn Phe Ser Gly Glu Ala	432																			
	130		135		140																
ctc tgg gaa ctg gag gta gca ggg ctg ggc tca gac cct cac ctc tcc	Leu Trp Glu Leu Glu Val Ala Gly Leu Gly Ser Asp Pro His Leu Ser	480																			
	145		150		155																
ctt gag ggc ttc aag gaa gga ggc att cag ctg agg ctc aga tcc agt	Leu Glu Gly Phe Lys Glu Gly Gly Ile Gln Leu Arg Leu Arg Ser Ser	528																			
	165		170		175																
ggc tgg tac ccc aag cct aag gtt cag tgg aga gac cac cag gga cag	Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Lys Val Gln Trp Arg Asp His Gln Gly Gln	576																			
	180		185		190																
tgc ctg cct cca gag ttt gaa gcc atc gtc tgg gat gcc cag gac ctg	Cys Leu Pro Pro Glu Phe Glu Ala Ile Val Trp Asp Ala Gln Asp Leu	624																			
	195		200		205																
ttc agt ctg gaa aca tct gtg gtt gtc cga gcg gga gcc ctc agc aat	Phe Ser Leu Glu Thr Ser Val Val Val Arg Ala Gly Ala Leu Ser Asn	672																			
	210		215		220																
gtg tcc gtc tcc atc cag aat ctc ctc ttg agc cag aag aaa gag ttg	Val Ser Val Ser Ile Gln Asn Leu Leu Leu Ser Gln Lys Lys Glu Leu	720																			
	225		230		235																
gtg gtc cag ata gca gac gtg ttc gta ccc gga gcc tct gcg tgg aag	Val Val Gln Ile Ala Asp Val Phe Val Pro Gly Ala Ser Ala Trp Lys	768																			
	245		250		255																
agc gga ggt gga ggc tcc gga ggt gga ggt tcc ggt gga ggt gga tcc	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	816																			
	260		265		270																
gac aaa act cac aca tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	864																			
	275		280		285																
gga ccg tca gtt ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	912																			
	290		295		300																
atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	960																			
	305		310		315																
gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	1008																			
	325		330		335																

cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac	1056
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
340 345 350	
cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc	1104
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
355 360 365	
aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc	1152
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
370 375 380	
gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg	1200
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
385 390 395 400	
tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc	1248
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser	
405 410 415	
ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag	1296
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
420 425 430	
tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc	1344
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
435 440 445	
gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg	1392
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
450 455 460	
gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg	1440
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
465 470 475 480	
cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct	1488
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
485 490 495	
ccg ggt aaa tga	1500
Pro Gly Lys	

<210> 19
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 19

Met Val Asp Leu Ser Val Ser Pro Asp Ser Leu Lys Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Val Phe Leu Met His Leu Leu Leu Leu Gln Pro Gly
20 25 30

Glu Pro Ser Ser Glu Val Lys Val Leu Gly Pro Glu Tyr Pro Ile Leu

ES 2 537 814 T3

35	40	45																	
Ala	Leu	Val	Gly	Glu	Glu	Val	Glu	Phe	Pro	Cys	His	Leu	Trp	Pro	Gln				
50						55					60								
Leu	Asp	Ala	Gln	Gln	Met	Glu	Ile	Arg	Trp	Phe	Arg	Ser	Gln	Thr	Phe				
65					70					75					80				
Asn	Val	Val	His	Leu	Tyr	Gln	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Pro	Gly	Arg	Gln				
			85						90					95					
Met	Pro	Ala	Phe	Arg	Asn	Arg	Thr	Lys	Leu	Val	Lys	Asp	Asp	Ile	Ala				
			100					105						110					
Tyr	Gly	Ser	Val	Val	Leu	Gln	Leu	His	Ser	Ile	Ile	Pro	Ser	Asp	Lys				
		115					120					125							
Gly	Thr	Tyr	Gly	Cys	Arg	Phe	His	Ser	Asp	Asn	Phe	Ser	Gly	Glu	Ala				
	130					135					140								
Leu	Trp	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Gly	Leu	Gly	Ser	Asp	Pro	His	Leu	Ser				
145					150					155					160				
Leu	Glu	Gly	Phe	Lys	Glu	Gly	Gly	Ile	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Ser	Ser				
				165					170					175					
Gly	Trp	Tyr	Pro	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Trp	Arg	Asp	His	Gln	Gly	Gln				
			180					185					190						
Cys	Leu	Pro	Pro	Glu	Phe	Glu	Ala	Ile	Val	Trp	Asp	Ala	Gln	Asp	Leu				
		195					200					205							
Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Val	Val	Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Leu	Ser	Asn				
	210					215					220								
Val	Ser	Val	Ser	Ile	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Lys	Lys	Glu	Leu				
225					230					235					240				
Val	Val	Gln	Ile	Ala	Asp	Val	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Trp	Lys				
				245					250					255					
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
		260						265					270						
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly				
	275						280					285							
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met				
	290					295					300								

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys

<210> 20
<211> 2070
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que codifican una proteína de fusión

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2070)

<400> 20

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

245	250	255	
gtt caa gtc gga gag aac ata gaa tta act tgt cac ctc tca cct caa Val Gln Val Gly Glu Asn Ile Glu Leu Thr Cys His Leu Ser Pro Gln 260 265 270			816
acg gat gct cag aac tta gag gtg agg tgg ctc cga tcc cgc tat tac Thr Asp Ala Gln Asn Leu Glu Val Arg Trp Leu Arg Ser Arg Tyr Tyr 275 280 285			864
cct gca gtc cac gtg tat gca aat ggc acc cac gtg gct gga gag cag Pro Ala Val His Val Tyr Ala Asn Gly Thr His Val Ala Gly Glu Gln 290 295 300			912
atg gta gaa tac aaa ggg agg act tca ttg gtg act gat gcc atc cac Met Val Glu Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Leu Val Thr Asp Ala Ile His 305 310 315 320			960
gag gga aaa ctg acc ctg cag att cac aat gcc aga act tcg gat gaa Glu Gly Lys Leu Thr Leu Gln Ile His Asn Ala Arg Thr Ser Asp Glu 325 330 335			1008
ggg cag tac cgg tgc ctt ttt gga aaa gat ggt gtc tac cag gag gcc Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Phe Gly Lys Asp Gly Val Tyr Gln Glu Ala 340 345 350			1056
cgt gtg gat gtg cag gtg acg gcg gtg ggt tcc acc cca cgg atc acc Arg Val Asp Val Gln Val Thr Ala Val Gly Ser Thr Pro Arg Ile Thr 355 360 365			1104
agg gag gtc ttg aaa gat gga ggc atg cag ctg agg tgt acg tct gat Arg Glu Val Leu Lys Asp Gly Gly Met Gln Leu Arg Cys Thr Ser Asp 370 375 380			1152
ggg tgg ttc cca cgg ccc cat gtg cag tgg agg gac aga gat gga aag Gly Trp Phe Pro Arg Pro His Val Gln Trp Arg Asp Arg Asp Gly Lys 385 390 400			1200
aca atg cca tcg ttt tcc gag gcc ttt cag caa ggg agc cag gag ctg Thr Met Pro Ser Phe Ser Glu Ala Phe Gln Gln Gly Ser Gln Glu Leu 405 410 415			1248
ttc cag gtg gag aca ctt ctg ctg gtc aca aac ggc tcc atg gtg aat Phe Gln Val Glu Thr Leu Leu Leu Thr Asn Gly Ser Met Val Asn 420 425 430			1296
gtg acc tgc tcc atc agc ctc cct ctg ggc cag gag aaa aca gcc cgt Val Thr Cys Ser Ile Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Lys Thr Ala Arg 435 440 445			1344
ttc cct ctc tca gac tcc aag tac gta gag ccc aga tct tgt gac aaa Phe Pro Leu Ser Asp Ser Lys Tyr Val Glu Pro Arg Ser Cys Asp Lys 450 455 460			1392
act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggc gcg ccg Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro 465 470 475 480			1440
tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser 485 490 495			1488
cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp 500 505 510			1536

cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat	1584
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	
515 520 525	
gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg	1632
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
530 535 540	
gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag	1680
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu	
545 550 555 560	
tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa	1728
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	
565 570 575	
acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc	1776
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	
580 585 590	
ctg ccc cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc	1824
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	
595 600 605	
tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag	1872
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	
610 615 620	
agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg	1920
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	
625 630 635 640	
gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag	1968
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	
645 650 655	
agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag	2016
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	
660 665 670	
gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt	2064
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
675 680 685	
aaa tga	2070
Lys	

<210> 21
 <211> 689
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 21

Met Val Asp Cys Pro Arg Tyr Ser Leu Ser Gly Val Ala Ala Ser Phe
1 5 10 15

Leu Phe Val Leu Leu Thr Ile Lys His Pro Asp Asp Phe Arg Val Val

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

Pro Ala Val His Val Tyr Ala Asn Gly Thr His Val Ala Gly Glu Gln
290 295 300

Met Val Glu Tyr Lys Gly Arg Thr Ser Leu Val Thr Asp Ala Ile His
305 310 315 320

Glu Gly Lys Leu Thr Leu Gln Ile His Asn Ala Arg Thr Ser Asp Glu
325 330 335

Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Phe Gly Lys Asp Gly Val Tyr Gln Glu Ala
340 345 350

Arg Val Asp Val Gln Val Thr Ala Val Gly Ser Thr Pro Arg Ile Thr
355 360 365

Arg Glu Val Leu Lys Asp Gly Gly Met Gln Leu Arg Cys Thr Ser Asp
370 375 380

Gly Trp Phe Pro Arg Pro His Val Gln Trp Arg Asp Arg Asp Gly Lys
385 390 395 400

Thr Met Pro Ser Phe Ser Glu Ala Phe Gln Gln Gly Ser Gln Glu Leu
405 410 415

Phe Gln Val Glu Thr Leu Leu Leu Val Thr Asn Gly Ser Met Val Asn
420 425 430

Val Thr Cys Ser Ile Ser Leu Pro Leu Gly Gln Glu Lys Thr Ala Arg
435 440 445

Phe Pro Leu Ser Asp Ser Lys Tyr Val Glu Pro Arg Ser Cys Asp Lys
450 455 460

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro
465 470 475 480

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
485 490 495

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
500 505 510

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
515 520 525

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
530 535 540

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
545 550 555 560

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
565 570 575

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
580 585 590

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
595 600 605

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
610 615 620

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
645 650 655

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
660 665 670

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
675 680 685

Lys

REIVINDICACIONES

1. Una proteína BTNL9 multimérica soluble que comprende

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2, y

5 (b) un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2,

en la que la ventana de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de (a) y (b) con los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2 es al menos de 80 aminoácidos de longitud.

en la que

10 (i) la proteína BTNL9 multimérica es al menos un tetrámero y/o

(ii) la proteína BTNL9 multimérica tiene un peso molecular cuatro veces mayor que el de un polipéptido de (a), y

en la que la proteína BTNL9 multimérica puede inhibir la proliferación de un linfocito T estimulado por un anticuerpo anti-CD3.

15 2. La proteína multimérica BTNL9 de la reivindicación 1, en la que los polipéptidos de (a) y (b) comprende cada uno una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2.

3. La proteína multimérica BTNL9 de la reivindicación 2, en la que los polipéptidos de (a) y (b) comprende cada uno una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 97% a los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2.

20 4. La proteína multimérica BTNL9 de la reivindicación 3, en la que los polipéptidos de (a) y (b) comprende cada uno la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 35-257 de la SEC ID N° 2.

5. La proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los polipéptidos de (a) y (b) no comprenden la secuencia de aminoácidos 258 a 277 de la SEC ID N° 2.

6. La proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los polipéptidos de (a) y (b) cada uno comprende otra secuencia de aminoácidos.

25 7. La proteína multimérica BTNL9 de la reivindicación 6, en la que la otra secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos de una parte Fc de un anticuerpo.

8. La proteína multimérica BTNL9 de la reivindicación 7, en la que:

(i) la parte Fc comprende la secuencia de aminoácidos de una región Fc nativa humana;

30 (ii) la parte Fc comprende una secuencia de aminoácidos que no tiene más de 5, 10, o 15 inserciones, deleciones, o sustituciones de un solo aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de una región Fc IgG nativa humana;

(iii) la parte Fc comprende la secuencia de aminoácidos de una región Fc nativa humana del isotipo IgG1, IgG2, o IgG4;

(iv) la parte Fc puede unirse a un receptor Fc neonatal humano (FcRn);

35 (v) la proteína multimérica BTNL9 es un homotetrámero o un homomultímero de mayor orden;

(vi) la proteína multimérica BTNL9 es un heteromultímero; y/o

(vii) la proteína multimérica BTNL9 tiene un peso molecular al menos 8 veces mayor que el peso molecular del polipéptido de (a) o (b).

40 9. El uso de un ácido nucleico que codifica la BTNL9 para la producción de la proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. El uso de un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 para la producción de la proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

45 11. El uso de una célula huésped que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 o el vector de acuerdo con la reivindicación 10 para la producción de la proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

12. Un procedimiento de fabricación de una proteína multimérica BTNL9 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende

cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 11 en un medio bajo condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico y

5 recuperar la proteína expresada de las células o el medio de cultivo.

13. La proteína multimérica BTNL9 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria.

14. La proteína multimérica BTNL9 para el uso de la reivindicación 13, en que el uso comprende las siguientes etapas:

10 (a) retirar los linfocitos T del paciente;

(b) estimular los linfocitos T con una combinación de proteínas que comprende un anticuerpo anti-CD3 y la proteína multimérica BTNL9;

(c) recolectar los linfocitos T estimulados; y

(d) devolver los linfocitos T recolectados al paciente.

15 15. La proteína multimérica BTNL9 para el uso de la reivindicación 13 o 14, en la que la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria es seleccionada de entre el grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, psoriasis, sarcoidosis, asma, o una enfermedad fibrótica.

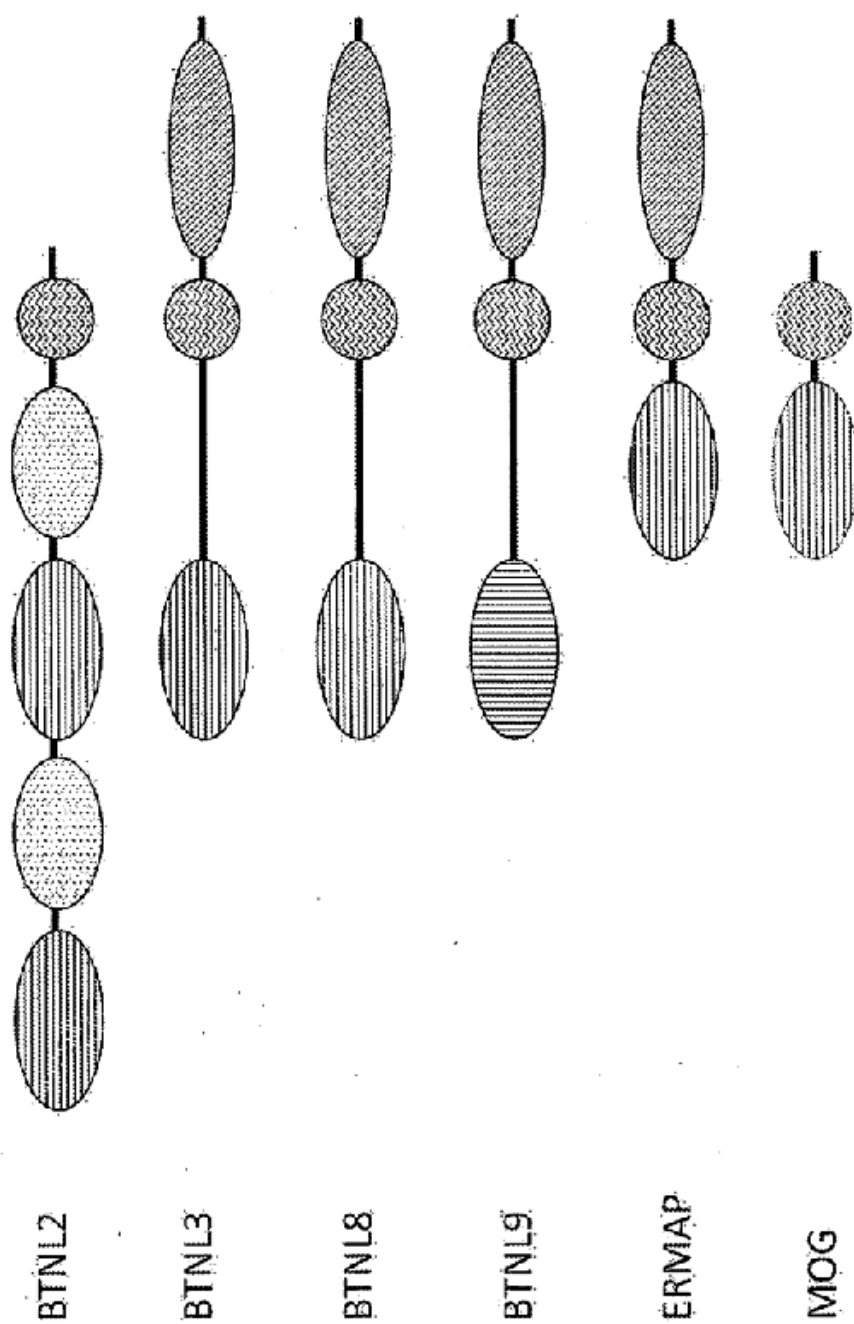


Figura 1

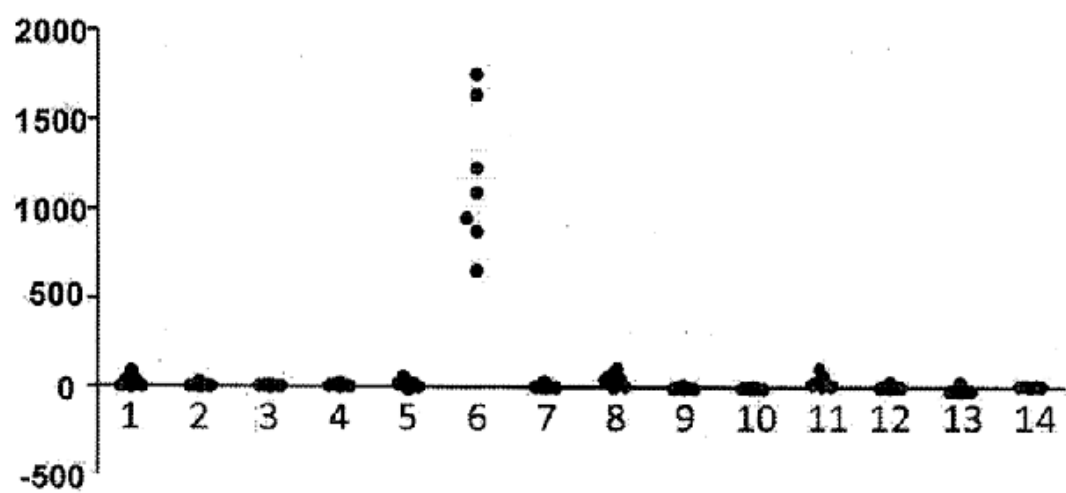


Figura 2

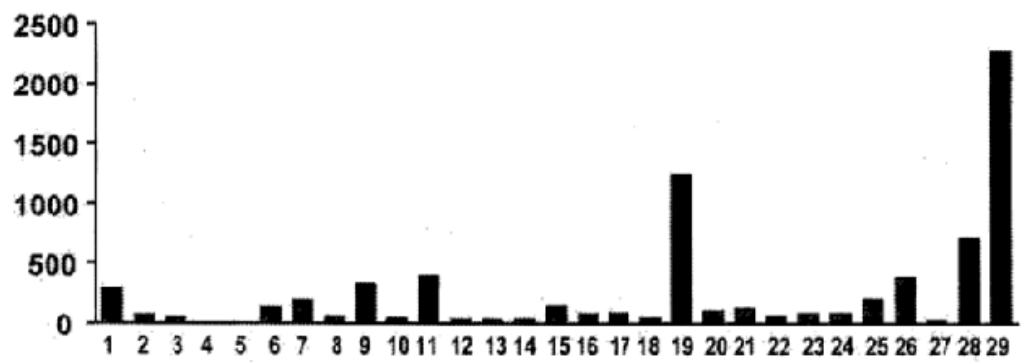


Figura 3

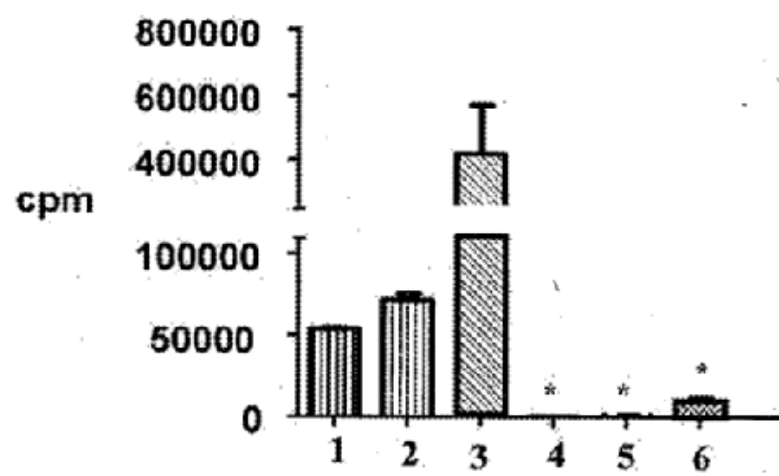


Figura 4

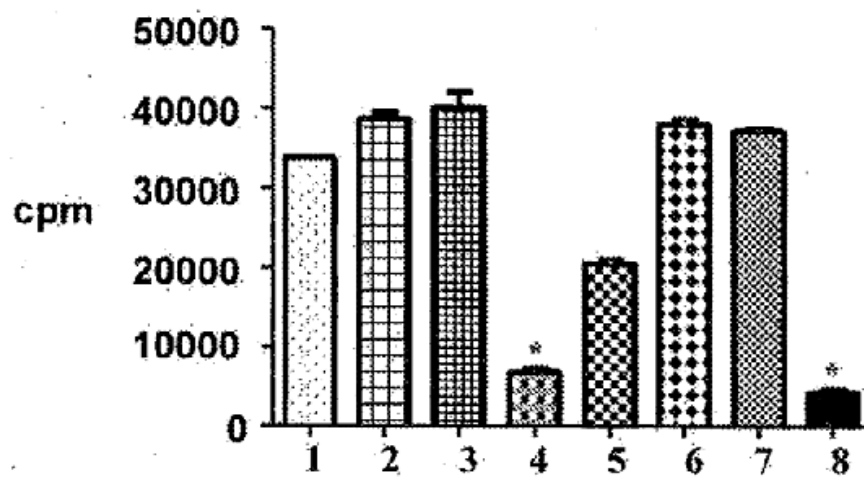


Figura 5

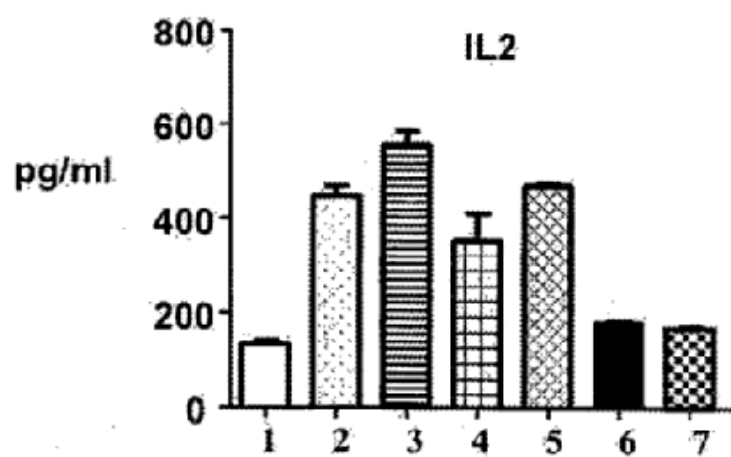


Figura 6A

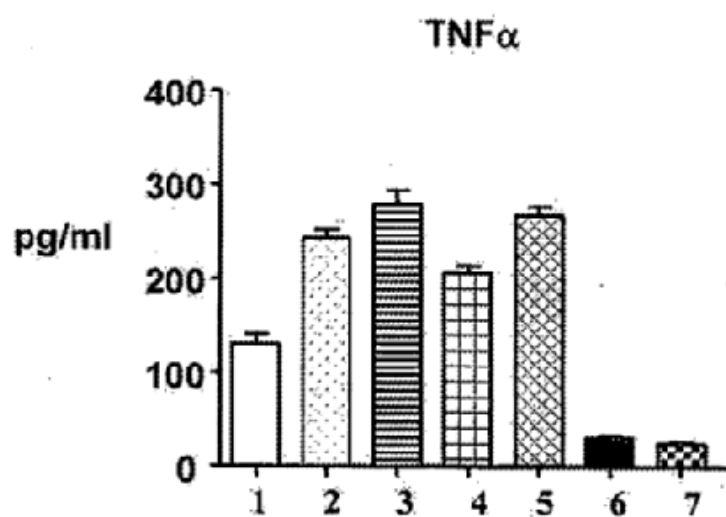


Figura 6B

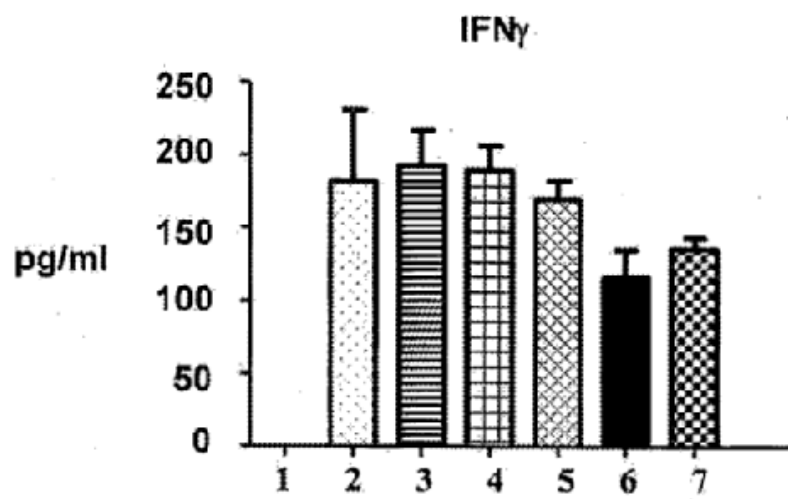


Figura 6C

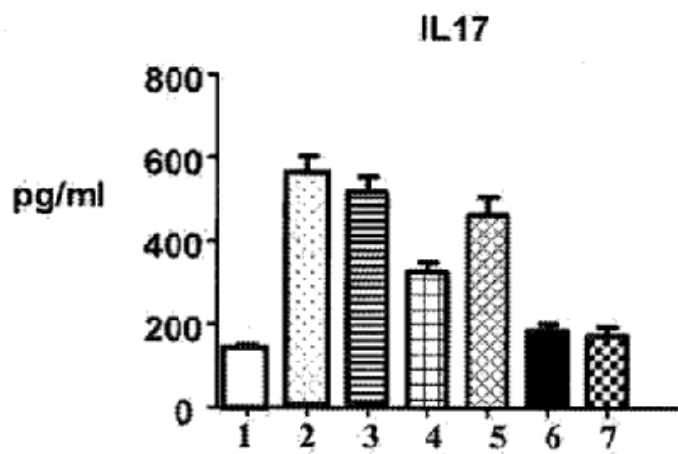


Figura 6D

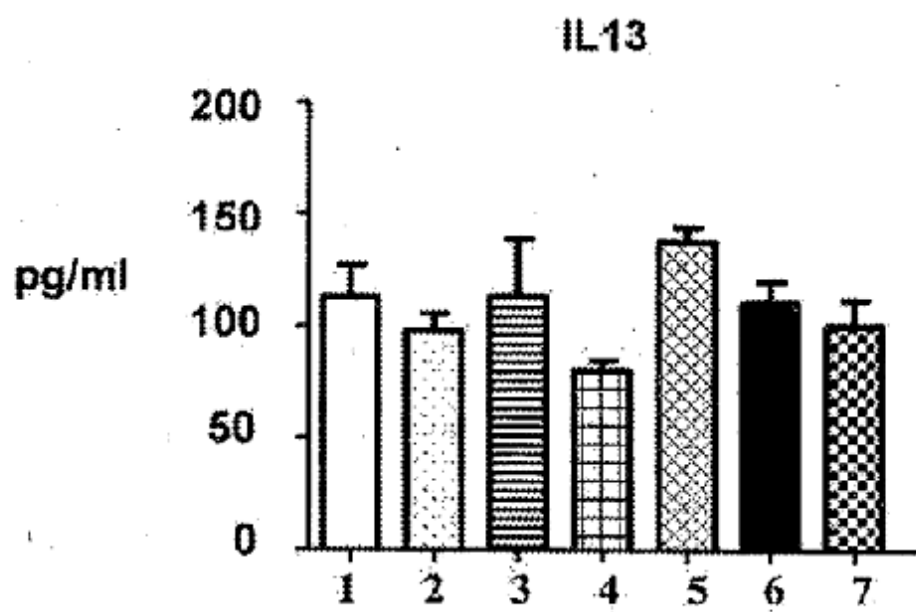


Figura 6E

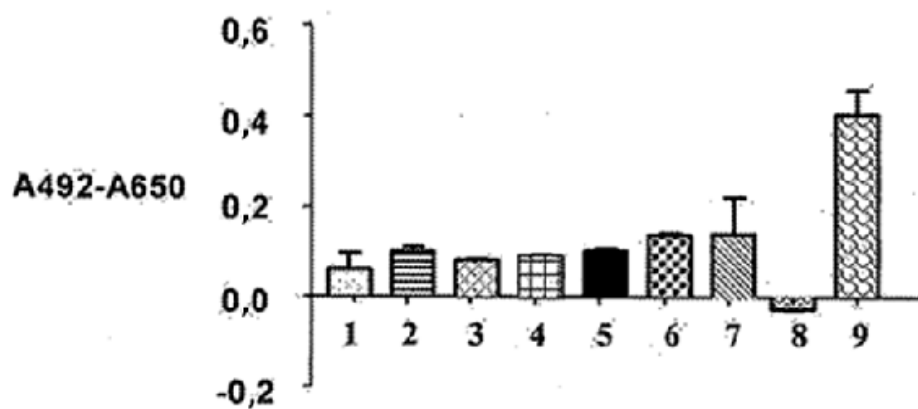


Figura 7A

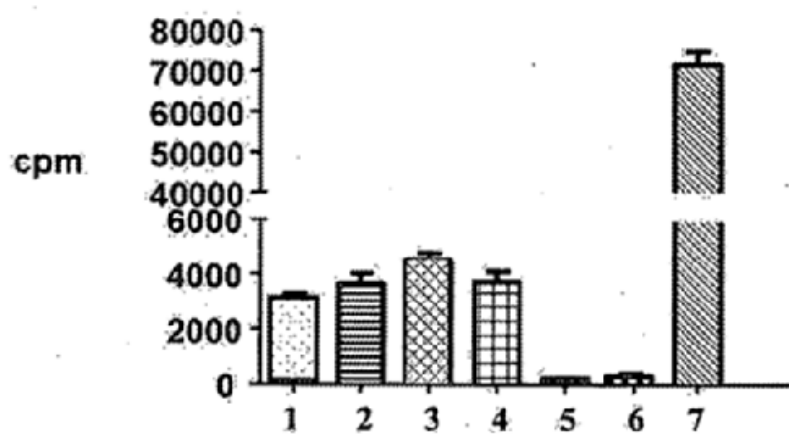


Figura 7B

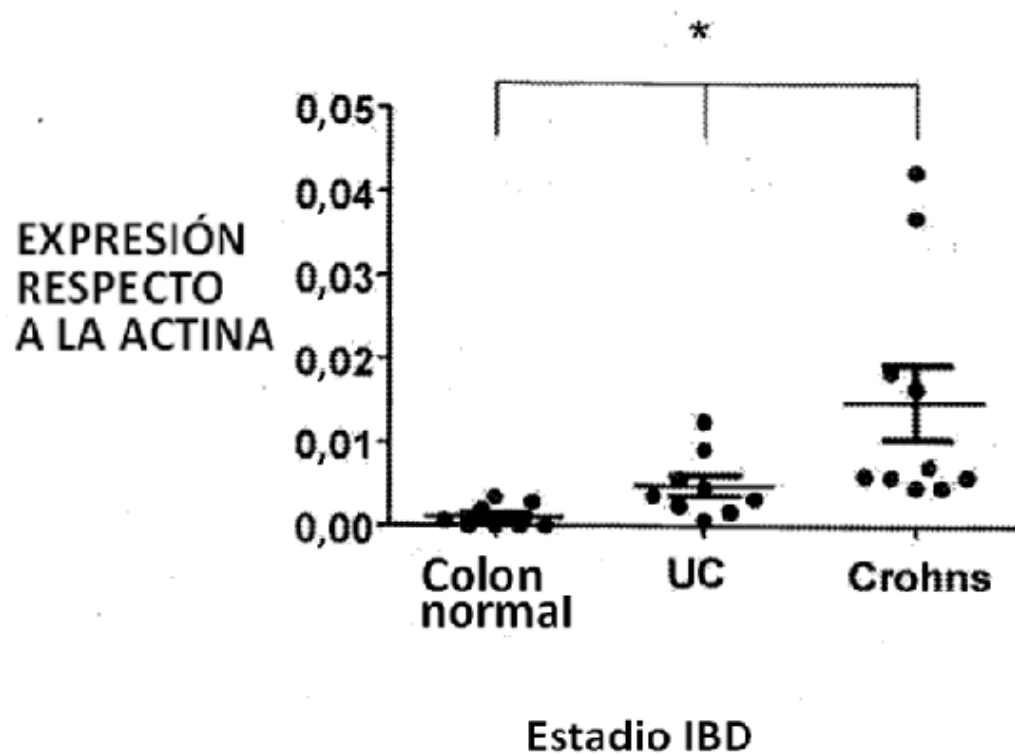


Figura 8

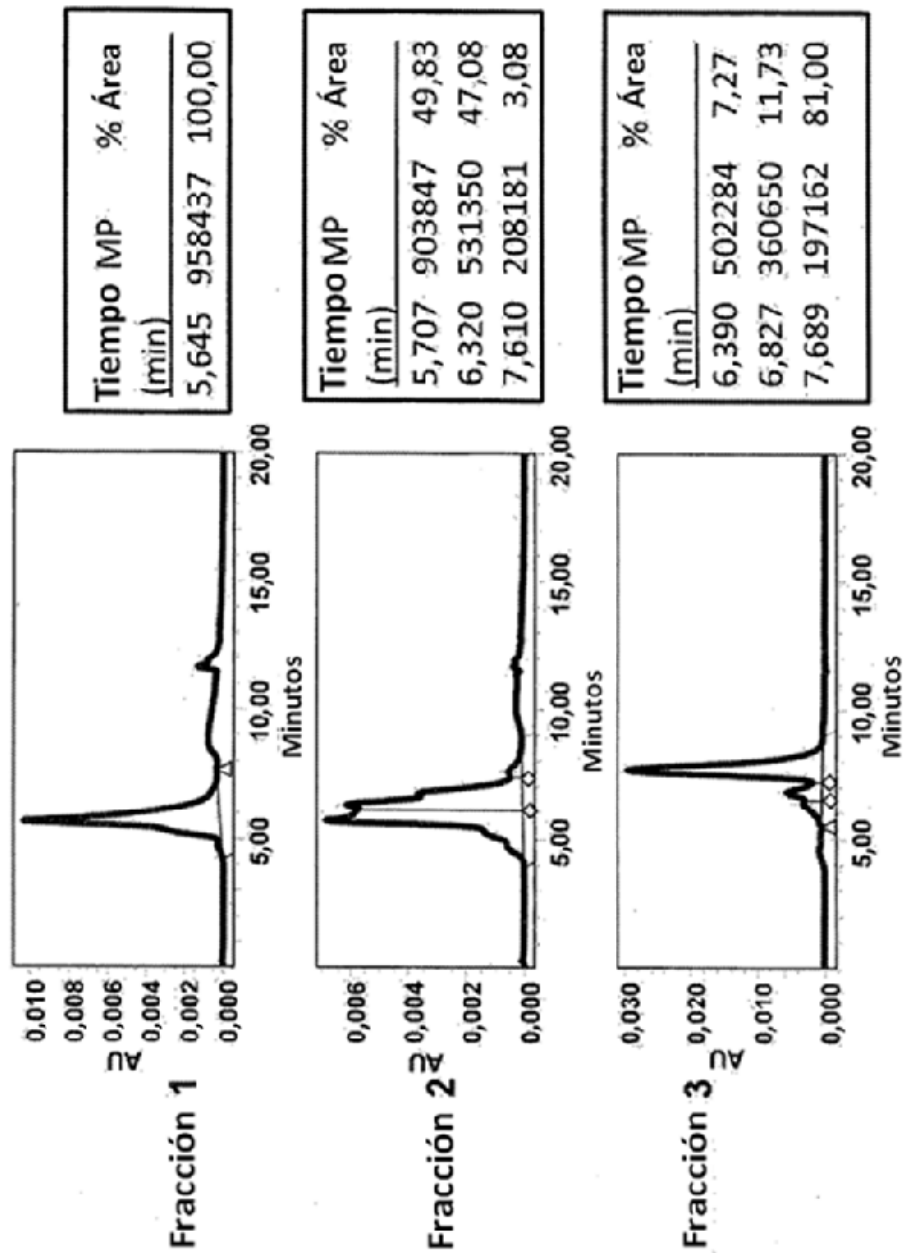


Figura 9

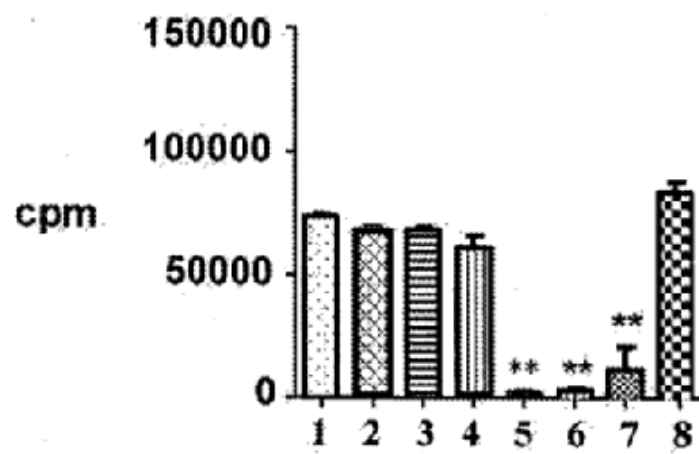


Figura 10

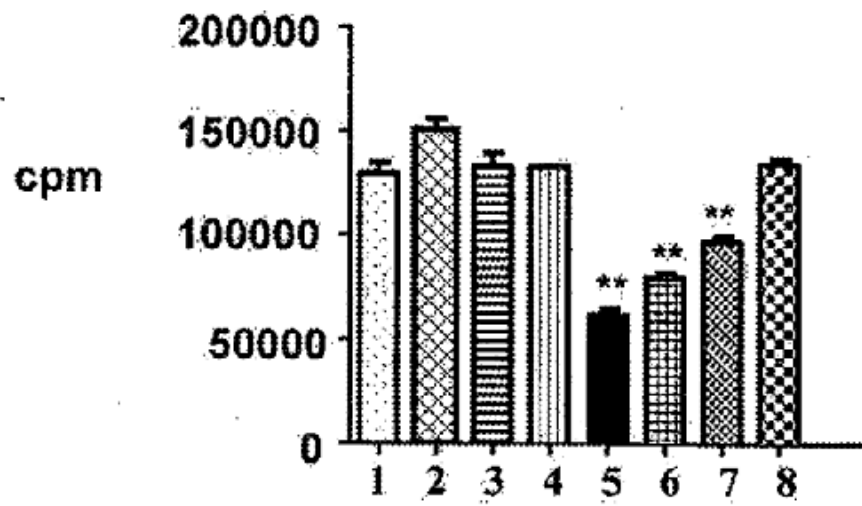


Figura 11

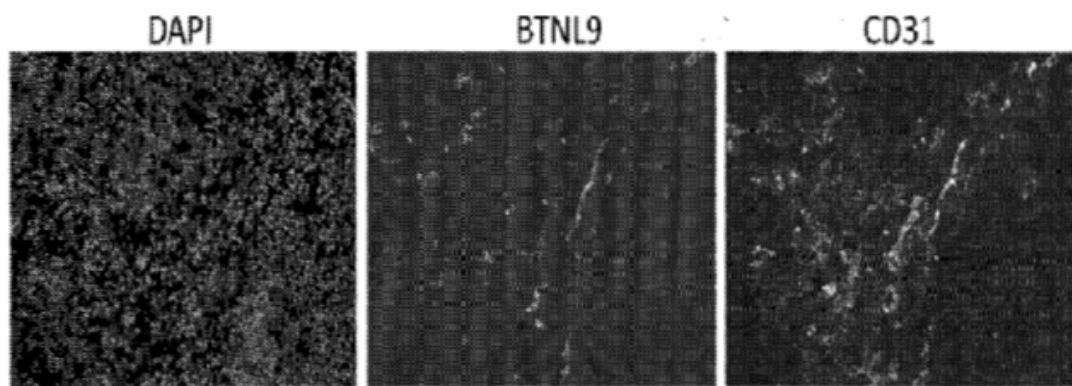


Figura 12