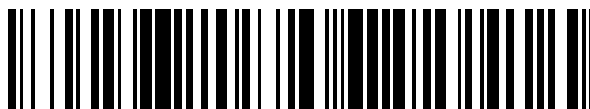


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 625**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2000 E 00983778 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1235847**

54 Título: **Aislamiento de cinco genes novedosos que codifican nuevos melanomas de tipo receptor de Fc implicados en la patogénesis del linfoma/melanoma**

30 Prioridad:

29.11.1999 US 168151 P

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

03.05.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
WEST 116TH STREET AND BROADWAY
NEW YORK, NEW YORK 10027, US**

72 Inventor/es:

DALLA-FAVERA, RICCARDO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 568 625 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

Aislamiento de cinco genes novedosos que codifican nuevos melanomas de tipo receptor de Fc implicados en la patogénesis del linfoma/melanoma

La invención descrita en la presente memoria se realizó en el curso del trabajo bajo la Concesión NCI Núm. CA 44029 del Instituto Nacional del Cáncer. En consecuencia, el Gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención.

A lo largo de toda esta solicitud, las diversas referencias se mencionan entre paréntesis.

Las citas bibliográficas completas para estas referencias se pueden encontrar al final de esta solicitud, antes de las reivindicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las anomalías del cromosoma 1q21 son comunes en las neoplasias malignas de células B, incluyendo el linfoma de células B y el mieloma, pero los genes elegidos como diana por estas aberraciones son en gran parte desconocidos. Mediante la clonación de los puntos de rotura de una translocación cromosómica t(1;14)(q21;q32) en una línea celular de mieloma, los autores de la presente invención han identificado dos nuevos genes, *IRTA1* e *IRTA2*, que codifican receptores de la superficie celular con homologías con las familias de Receptores de Fc e Inhibidores. Ambos genes se expresan normalmente en las células B maduras, pero con diferentes distribuciones en los órganos linfoides periféricos: *IRTA1* se expresa en células B de la zona marginal, mientras *IRTA2* también se expresa en centrocitos del centro germinal y en inmunoblastos. Como resultado de la translocación t(1;14), el péptido señal *IRTA1* se fusiona con el dominio C α de la Inmunoglobulina para producir una proteína de fusión *IRTA1*/Ca quimérica. En las líneas celulares de mieloma múltiple y de linfoma de Burkitt con anomalías en 1q21, la expresión de *IRTA2* está desregulada. Por lo tanto, *IRTA1* e *IRTA2* son inmunorreceptores novedosos con un papel potencialmente importante en el desarrollo de células B y la linfomagénesis.

El linfoma de células B no Hodgkin (LNH-B) y el mieloma múltiple (MM) representan un grupo heterogéneo de neoplasias malignas derivadas de células B maduras con fenotipos correspondientes a células del pre-Centro Germinal (CG) (células del manto), GC (células grandes difusas, foliculares, de Burkitt), o post-CG (MM) (para la revisión, Gaidano y Dalla-Favera, 1997; Kuppers et al., 1999). Se ha obtenido una información valiosa en torno a la patogénesis de estas neoplasias malignas mediante la identificación de anomalías cromosómicas clonales recurrentes características para los subtipos específicos de las enfermedades. La consecuencia común de estas translocaciones es la desregulación transcripcional de los protooncogenes por su yuxtaposición a los elementos reguladores de la transcripción heterólogos localizados en el cromosoma compañero (Gaidano y Dalla-Favera, 1997). Estos elementos reguladores de la transcripción heterólogos pueden derivar del locus de inmunoglobulina (IG) o de otros loci cromosómicos del compañero. Los ejemplos incluyen *MYC* en t(8;14) (q24;q32) en el linfoma de Burkitt (LB) (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982), el gen *CCND1* desregulado por la t(11;14) (q13;q32) en el linfoma de células del manto (LCM) (Rosenberg et al., 1991) y mieloma múltiple (MM) (Ronchetti et al., 1999), *BCL2* implicado en la t(14;18) (q32;q21) en el linfoma folicular (LF) (Bakhshi et al., 1985), *BCL6* en t(3;14) (q27;q32) en linfoma difuso de células B grandes (LDCG) (Ye et al., 1993), así como *FGFR3* en t(4;14) (p16;q32). (Chesi et al., 1997), *MAF* en t(14;16) (q32;q23) (Chesi et al., 1998) y *MUM1/IRF4* en t(6;14) (p25;q32) (Iida et al., 1997) en el mieloma múltiple (MM). La identificación de estos oncogenes ha ofrecido información valiosa sobre la patogénesis y el diagnóstico de sus correspondientes neoplasias malignas.

Las anomalías cromosómicas que están implicadas en la banda 1q21-q23 se encuentran entre las lesiones genéticas más frecuentes tanto en LNH-B como en MM. Entre los subtipos de LNH, se ha informado sobre puntos de rotura en 1q21-q23, incluyendo translocaciones y duplicaciones, a menudo como la única anomalía cromosómica, en 17-20% de los linfomas de células B grandes difusos y foliculares (LDCG), en 39% de los linfomas de células B de la zona marginal (Offit et al., 1991; Whang Peng et al., 1995; Cigudosa et al., 1999) y en de 27-38% de los linfomas de Burkitt, donde representan la segunda anomalía citogenética más común después de translocaciones que implican al proto-oncogén *MYC* (Berger y Bernheim, 1985; Kornblau et al., 1991). La hibridación comparativa del genoma (HCG) también ha identificado 1q21-q23 como un sitio recurrente para la amplificación de alto nivel en 10% de los casos de LDCG (Rao et al., 1998). En el MM, la trisomía de la región 1q21-q32 ha sido referida en 20-31% de los casos (Sawyer et al., 1995), la amplificación de la región 1q12-qter en 80% de las líneas celulares y 40% de los tumores primarios (Avet-Loiseau et al., 1997), y las translocaciones de todo el brazo desequilibradas no aleatorias de 1q, asociadas con la multiduplicación de la región adyacente 1q21-22, se encontraron en 23% de los pacientes con cariotipos anormales (Sawyer et al., 1998).

La alta frecuencia de implicación de los reordenamientos estructurales 1q21 en las neoplasias malignas de células B sugiere que este locus puede albergar genes críticos para la patogénesis de estas enfermedades. La clonación de una t(1;14)(q21;q32) en una línea celular de leucemia linfoblástica aguda pre-B identificó previamente un nuevo gen, *BCL9* desregulado solamente en este caso (Willis et al., 1998), pero no implicado en otros casos. Un informe

reciente caracterizó la t(1;22) (q22;q11) en una línea celular de linfoma folicular (LF) y se encontró que el locus *FCGR2B*, que codifica el receptor Fc de IgG de baja afinidad FCGR11b, era elegido como diana en esta línea celular y en dos casos adicionales de FL (Callanan et al., 2000). Por último, el locus *MUC1* ha sido identificado en la proximidad del punto de rotura de una t(1;14)(q21;q32) en NHL (Dyomin et al., 2000; Gilles et al., 2000), y se han encontrado reordenamientos del locus *MUC1* en 6% de los NHL con anomalías 1q21 (Dyomin et al., 2000). Estos resultados ponen de manifiesto la heterogeneidad de los puntos de rotura de 1q21 y la necesidad de identificar oncogenes candidatos adicionales situados en este locus, ya que la gran mayoría de estas alteraciones permanecen sin explicación.

El documento EP-A2 0 330 191 describe un método para la clonación de ADNc a partir de bibliotecas de expresión de mamíferos basadas en la expresión transitoria en células anfitrionas de mamífero.

La Base de Datos EMBL, clon IMAGE: 1333716, Núm. de Acceso de la Base de datos AA811806 describe una secuencia de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) humano de 475 pares de bases (AA811806.1), la Base de Datos EMBL, clon IMAGE: 2301418, Núm. de Acceso de la Base de datos A1699363 (EST humano) describe una secuencia de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) humano de 429 pares de bases. La Base de Datos EMBL, clon IMAGE: 1327317. Núm. de Acceso de la Base de datos AA724600 describe una secuencia de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) humano de 422 pares de bases.

El objetivo de este estudio fue explorar más a fondo la arquitectura de los reordenamientos cromosómicos 1q21 en neoplasias malignas de las células B. Para ello, los autores de la presente invención han empleado un enfoque de clonación molecular de la t(1;14)(q21;q32) presente en la línea celular de mieloma FR4. Los autores de la presente invención han identificado dos nuevos genes que son elegidos como diana diferencialmente por anomalías de 1q21. Estos genes codifican cinco nuevos miembros de la familia de receptores de inmunoglobulina, *IRTA1*, *IRTA2*, *IRTA3*, *IRTA4* y *IRTA5* (Immunoglobulin superfamily Receptor Translocation Associated genes (Genes asociados a la translocación de receptores de la superfamilia de inmunoglobulina) 1, 2, 3, 4, y 5), que pueden ser importantes para la función de los linfocitos normales y para las neoplasias malignas de células B.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína receptora de inmunoglobulina, Asociada a la Translocación de Receptores de la superfamilia de Inmunoglobulinas, IRTA2.

Se describe un método para producir un polipéptido IRTA (proteína) que comprende: (a) introducir un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína receptora de inmunoglobulina, Asociada a la Translocación de Receptores de la superfamilia de Inmunoglobulinas, IRTA, en una célula anfitriona adecuada; y (b) cultivar la célula resultante para producir el polipéptido.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína IRTA2, o uno o varios fragmentos de la misma, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las Figuras 18B-1-18B-3.

Esta invención proporciona un método para detectar una neoplasia maligna de células B o un tipo de neoplasia maligna de células B en una muestra de un sujeto en donde la neoplasia maligna de células B comprende una reordenación cromosómica 1q21, que comprende:

a) poner en contacto el ARN de una muestra obtenida del sujeto con una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos contiguos capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica la proteína IRTA2 humana en condiciones que permiten la hibridación del ARN de la etapa (a) con la molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica una proteína IRTA2 humana, en donde la molécula de ácido nucleico está marcada con un marcador detectable; y b) detectar cualquier hibridación en la etapa (a), en donde la detección de hibridación indica la presencia de neoplasia maligna de células B o un tipo de neoplasia maligna de células B en la muestra.

Esta invención proporciona un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar la expresión en exceso de la molécula de ARNm.

Esta invención proporciona una proteína IRTA2 purificada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3 (SEQ ID NO: 3).

Esta invención proporciona uno o varios anticuerpos dirigidos a un epítipo de una proteína IRTA2 purificada, o uno o varios fragmentos de los mismos, que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3.

Esta invención proporciona un anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 purificada.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad del anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar el crecimiento de las células cancerosas y un portador farmacéuticamente aceptable.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de cualquiera de los oligonucleótidos de moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas IRTA2 descritas en la presente memoria eficaz para prevenir la expresión en exceso de una proteína IRTA2 humana y un portador farmacéuticamente aceptable idóneo. Esta invención proporciona un método de diagnóstico de neoplasias malignas de células B que comprende una reordenación cromosómica 1q21 en una muestra de un sujeto que comprende:

- a) poner en contacto la muestra obtenida del sujeto con un anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 purificada capaz de unirse específicamente con una proteína IRTA2 humana sobre la superficie celular de una célula cancerosa en condiciones que permiten la unión del anticuerpo con la proteína IRTA2 humana sobre la superficie celular de la célula cancerosa, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable; y
- b) detectar cualquier unión en la etapa (a), en donde la detección de la unión indica un diagnóstico de neoplasia maligna de células B en la muestra.

Se describe un método para detectar la proteína IRTA humana en una muestra que comprende: a) poner en contacto la muestra con cualquiera de los anticuerpos anti-IRTA descritos anteriormente bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la IRTA en la muestra; y b) detectar el complejo formado en la etapa (a), detectando de ese modo la presencia de IRTA humana en la muestra.

Esta invención proporciona el uso para el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B, que comprende administrar al sujeto una cantidad de anticuerpo anti-IRTA2 eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA2 con el fin de evitar el crecimiento de las células cancerosas y un portador farmacéuticamente aceptable, tratando de este modo al sujeto.

Esta invención proporciona un uso para el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar la expresión en exceso de la proteína IRTA2 humana, con el fin de detener el crecimiento celular o inducir la muerte celular de las células cancerosas que expresan la proteína IRTA2 y un portador farmacéuticamente aceptable, tratando de este modo al sujeto.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra un epítipo de la proteína IRTA2 descrita en la presente memoria y un portador farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1B.

Clonación molecular de la translocación t(1;14)(q21;q32) en la línea celular de mieloma múltiple FR4. Fig. 1A) Representación esquemática de los clones λ FR4B-5 y λ FR4S-a, que representan los puntos de rotura der(14) y der(1), y de la línea germinal IgH y loci 1q21. Fig. 1B) Secuencia de nucleótidos de la unión del punto de rotura y su alineamiento con las regiones correspondientes de la línea germinal del cromosoma 14. S α , región de cambio de IgA; LCR: región de control del locus 3' IgH; B, *Bam*HI; H, *Hind*III; X, *Xho*I.

Figuras 2A-2B.

Mapa genómico del locus 1q21 en las proximidades del punto de rotura FR4. Fig. 2A) Mapa de endonucleasas de restricción y representación esquemática de clones genómicos, es decir, bacteriófagos (1), cromosomas artificiales P1 (PAC) (2), y cromosoma artificial de levadura (YAC) (3), que abarca el locus de 1q21 de la línea germinal en la región del punto de rotura de FR4 (punta de flecha). El nombre de cada clon se coloca directamente sobre la parte superior de su representación. Los fragmentos finales derivados de los insertos de PAC y YAC se representan como círculos, ya sea con una orientación del vector SP6/T7 (PAC), ya sea con una orientación del vector del brazo izquierdo/derecho (YAC). El panel superior de la Fig. 1A representa la organización genómica de dos genes que rodean el punto de rotura de FR4. Los dos genes fueron identificados por la captura del exón de PAC 49A16. Están estrechamente espaciados en el genoma, dentro de ≤ 30 Kb uno de otro y se denominan MUM2 y MUM3 (mieloma múltiple 2 y 3). En el esquema de sus loci genómicos, los recuadros de color negro indican los exones codificantes, mientras que los recuadros de color blanco y gris claro o medio indican exones no codificantes. Los intrones conectores son líneas. MUM3 (izquierda) da lugar a tres ARNm empalmados alternativamente, que comparten todos una región no traducida 5' común (UTR), pero diversas UTR 3' (marcadas por diferentes tonos). Los números debajo de los

recuadros identifican el orden de los exones del ADNc. Los exones menores de 100 pb se representan como líneas verticales delgadas. La posición y el tamaño de cada exón se determinaron por medio de secuenciación de clones genómicos de PAC y de fagos y por hibridación de sondas de ADNc con ADN del clon digerido con endonucleasas. El mapeo de PAC y YAC se realizó por digestión parcial con enzimas de corte raro seguido de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado e hibridación con sondas internas y derivadas de los extremos. Las líneas discontinuas alinean las regiones de solapamiento. S, SacI; H, HindIII; S, Sma; P, PstI; P, Pml; Fig. 2B) Mapa de conexiones genéticas Genethon de 1q21 en la región del locus MUM2/MUM3. Los sitios de secuencia expresada (STS) se ordenan a una distancia aproximada determinada previamente por Dib, C., et al., (1996) Nature, 380: 162-164. El STS WI-5435 (en negrita) está contenido dentro de YAC 23GC4 y PAC 49A16. Las líneas verticales paralelas representan segmentos interrumpidos, cuyo tamaño aproximado se representa anteriormente en megabases (Mb). El dimensionamiento se estimó por el tamaño de los cóntigos de YAC no quiméricos entre dos marcadores. El gen BCL9 en el centrómero fue clonado a partir de un punto de rotura de t(1;14)(q21;q32) diferente por Willis T.G. et al., (1998) Blood 91, 6: 1873-1881. El gen FcGR1A está en el límite de la banda cromosómica 1q21-q22.

Figuras 3A-3C.

Estructura del ARNm y patrón de expresión de MUM2. Fig. 3A) Representación esquemática del ARNm de MUM2. Los recuadros grandes rellenos representan los dominios codificantes y los recuadros vacíos estrechos representan regiones no traducidas. SP, péptido señal; EC, dominio extracelular; TM, dominio transmembrana; CIT, dominio citoplásmico; A(n), cola poliA. La región extracelular se compone de cuatro dominios similares a inmunoglobulina tal como se representa. Las señales de poliadenilación alternativas (flechas) generan tres especies de ARNm de MUM2 (a, b, c) cuya longitud (en Kb) oscila de 2,6 a 3,5. Fig. 3B) Análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de MUM2 en tejidos humanos del sistema inmunitario. La sonda de ADNc utilizada para el análisis se muestra como una barra continua de color negro debajo del esquema del ARNm en la Fig. 3A). Cada calle contiene 2 µg de ARNm del tejido correspondiente. En el lado derecho de la transferencia, se representa la posición de los marcadores de peso molecular de ARN. La posición de los transcritos de ARNm de MUM2 y GAPDH se muestra por medio de flechas. (Se incluyó una sonda de GAPDH en la hibridación como un control interno - sonda marcada 0,15 ng + no marcada 50 ng). Los resultados de este análisis muestran expresión débil de MUM2 en los ganglios linfáticos y el bazo. No se detectó expresión de MUM2 en una variedad de tejidos humanos distintos (datos no mostrados). Fig. 3C) Análisis de transferencia Northern de la expresión de MUM2 en ARN total de EREB, una línea de células linfoblastoides B transformadas con EBV condicional. EREB lleva, el genoma de EBV con una proteína de fusión de EBNA2-receptor de estrógeno, activa sólo en presencia de estrógeno. Para este experimento, las células fueron cultivadas en presencia de estrógeno (1 µg/ml), seguido de la retirada de estrógeno durante los momentos indicados. Tras la retirada de estrógeno, las células EREB se someten a la detención G0/G1, determinada por la pérdida de la expresión de c-myc. En la Fig. 3C, una transferencia Northern del ARN total de EREB [10 µg por calle] se hibridó con la sonda de ADNc de MUM2 mostrada en la Fig. 3A y la sonda de control interno de GAPDH, como en la Fig. 3B. Las flechas indican la posición de los ARNm correspondientes en la transferencia de EREB. a, la banda C corresponde a la especie MUM2 en el panel de la Fig. 3A. A continuación, la misma transferencia se eliminó y se volvió a sondear con una sonda de ADNc de c-myc (exón 2) para verificar detención en la G0/G1 celular. La cuantificación del ARNm de MUM2 por medio del uso de un análisis densitométrico Phosphorimager demuestra un aumento de 10 veces en sus niveles en el plazo de 48 horas de la retirada de estrógeno, lo que sugiere que la expresión de MUM2 es elevada ya que las células entran en una fase de reposo.

Figuras 4A-4B.

Estructura de ARNm y patrón de expresión de MUM3. Fig. 4A) Representación esquemática del ARNm de MUM3. Los recuadros grandes rellenos representan dominios codificantes y los recuadros vacíos estrechos o de color gris representan regiones no traducidas. SP, péptido señal; EC, dominio extracelular; TM, dominio transmembrana; CIT, dominio citoplásmico; A(n), cola poliA. La región extracelular se compone de dominios de tipo inmunoglobulina, tal como se representa. El empalme alternativo genera cuatro especies de ARNm con diversa localización subcelular. Se secretan las proteínas MUM3-a y d, mientras que MUM3-b contiene un tramo hidrófobo de aminoácidos en su extremo C-terminal que puede servir como señal para la adición de un anclaje de glicofosfatidil-inositol (ancla de GPI), como se muestra. MUM3-c se extiende por la membrana plasmática. La identidad de secuencia entre las especies se indica mediante un relleno idéntico. Fig. 4B) Análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de MUM3 en múltiples tejidos humanos (izquierda) y en diversas líneas celulares linfoides y no linfoides (derecha). La sonda de ADNc utilizada se muestra como una barra continua debajo del esquema de ADNc en la Fig. 4A. Cada calle contiene 2 µg de ARNm del tejido o la línea celular correspondiente. La posición de los transcritos de ARNm de MUM3 y GAPDH se muestra por medio de flechas. (Se incluyó una sonda de GAPDH en la hibridación como control interno como se describe en la Fig. 3). a, b, c y d corresponden a la especie de ARNm de MUM3 mostrada en la Fig. 4A. RD, NC42 y CB33, líneas de células B linfoblastoides transformadas con virus de Epstein-Barr; EREB, línea celular linfoblastoide B transformada con EBV condicional; FR4, línea de células de plasma; MOLT4 y HUT78, líneas de células T; HL60 y U937, líneas de células mielomonocíticas; K562, línea de células eritroides. Los resultados sugieren que MUM3 se expresa exclusivamente en los tejidos del sistema inmunitario de la médula ósea, la linfa y el bazo y en particular en las células B con un fenotipo linfoblastoide.

Figura 5.

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de MUM2 humano. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra por encima de la secuencia de nucleótidos con el código de una letra y se numera a la derecha, con la posición 1 ajustada al primer codón del péptido señal. El sitio de la peptidasa señal pronosticado se obtuvo por medio de un algoritmo informático descrito por Nielsen et al., Protein Engineering 10, 1-6 (1997) y se marca por medio de una punta de flecha. La señal de poliadenilación AATAAA está subrayada. Los sitios potenciales para la N-glicosilación están subrayados también en la secuencia de aminoácidos. Un tramo hidrófobo de 16 aminoácidos que se pronostica que abarca la membrana plasmática está doblemente subrayado. Los sitios de unión a SH2 consenso se destacan por medio de un subrayado ondulado.

Figura 6A.

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de MUM3-a humana. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra por encima de la secuencia de nucleótidos con el código de una letra y se numera a la derecha, con la posición 1 ajustada al primer codón del péptido señal. El sitio pronosticado para la escisión de la peptidasa señal se obtuvo como se ha indicado anteriormente y se marca por medio de una punta de flecha. La señal de poliadenilación AATAAA está subrayada. Los sitios potenciales para la N-glicosilación también están subrayados en la secuencia de aminoácidos. La proteína carece de un dominio transmembrana y se prevé que sea secretada.

Figura 6B.

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos MUM3-b humana. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra por encima de la secuencia de nucleótidos con el código de una letra y se numera a la derecha, con la posición 1 ajustada al primer codón del péptido señal. El sitio pronosticado para la escisión de la peptidasa señal se obtuvo como se ha indicado anteriormente y se marca por medio de una punta de flecha. La señal de poliadenilación AATAAA está subrayada. Los sitios potenciales para la N-glicosilación están subrayados en la secuencia de aminoácidos.

Figura 6C-1-6C-2.

Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de MUM3-c humana. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra por encima de la secuencia de nucleótidos con el código de una letra y se numera a la derecha, con la posición 1 ajustada al primer codón del péptido señal. El sitio pronosticado para la escisión de la peptidasa señal se obtuvo como se ha indicado anteriormente y se marca por medio de una punta de flecha. La señal de poliadenilación AATAAA está subrayada. Los sitios potenciales para la N-glicosilación están subrayados en la secuencia de aminoácidos. Un tramo hidrófobo de 23 aminoácidos que se pronostica que abarca la membrana plasmática está doblemente subrayado. Los sitios de unión a SH2 consenso se destacan por medio de un subrayado ondulado.

Figuras 7A-7C.

t(1;14)(q21;q32) en FR4 genera un transcrito de fusión MUM2/Ca. Fig. 7A) Representación esquemática del clon genómico der(14) λFR4B-5 y del locus IgHA1 de la línea germinal. El punto de rotura de FR4 está marcado por medio de una flecha. Los recuadros rellenos y huecos representan los exones codificantes de MUM2 y Calfa y los no codificantes, respectivamente. La posición de la sonda 1 para el exón de MUM2 utilizada para el análisis de transferencia Northern se muestra por medio de una barra. Fig. 7B) El análisis de transferencia Northern con una sonda para el exón 1 de MUM2 sobre FR4 y líneas celulares adicionales detecta un mensaje anormal de 0,8 Kb, selectivamente en FR4. Las puntas de flecha apuntan a la ubicación de mensaje normal de MUM2 en el ARNm de EREB. JJN3 y U266, líneas celulares de mieloma; EREB, línea celular linfoblastoide B transformada con EVB condicional. Se cargaron dos µg de ARN poliA+ por calle. Fig. 7C) Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del ADNc de la fusión MUM2-Ca en FR4. El ADNc se amplificó por medio de RT-PCR a partir del ARN total de FR4 usando los cebadores mostrados en la Fig. 7A, y posteriormente se subclonó y se secuenció. La secuencia de aminoácidos deducida se muestra por encima de la secuencia de nucleótidos con el código de una letra y se numera a la derecha con la posición 1 ajustada al primer codón del péptido señal. El sitio pronosticado para la escisión de la peptidasa señal se obtuvo como se ha indicado anteriormente y se marca por medio de una punta de flecha. La señal de poliadenilación AATAAA está subrayada. El dominio transmembrana Calfa está subrayado. La porción MUM2 del ADNc se muestra en cursiva. H, HindIII; B, BamHI; X, XhoI; Sα, región de cambio de IgA; EC, región extracelular; TM, transmembrana; CIT, dominio citoplásmico.

Figuras 8A-8C.

Clonación molecular de la translocación t(1;14)(q21;q32) en la línea celular de mieloma múltiple FR4. Fig. 8A) Representación esquemática de los clones de fagos que representan los puntos de rotura der(14) y der(1) y los loci IGH y 1q21 de la línea germinal. Se indican 14 secuencias de cromosomas mediante una línea continua de color negro representando los recuadros de color negro los exones Ca1. Las secuencias del cromosoma 1 se muestran como una línea de color gris. Las sondas utilizadas para el mapeo cromosómico se indican debajo del mapa. Los códigos para las enzimas de restricción son: B, BamHI; H, HindIII; X, XhoI; S, SacI; E, EcoRI. Para las enzimas marcadas con un (*) sólo se muestran los sitios que delinean las sondas.

Sa: región de cambio de IgA; LCR: región de control del locus 3'IgH. Fig. 8B) Secuencia de nucleótidos de las uniones de los puntos de rotura y su alineamiento con las correspondientes regiones de la línea germinal de los cromosomas 14 y 1. Fig. 8C) A la izquierda, análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH) sobre dispersiones de metafase humana normales abarcando el clon PAC 49A16 (Fig. 13) la región 1q21 de la línea germinal en el punto de rotura de FR4. Derecha, imagen teñida con DAPI de la misma dispersión de metafase.

Figuras 9A-9B.

Estructura de los ADNc de *IRTA1* e *IRTA2*. Figs.9A, 9B) Representación esquemática de los ADNc de *IRTA1* (Fig. 9A) e *IRTA2* (Fig. 9B) completos. Los recuadros rellenos, grandes representan dominios codificantes y los recuadros estrechos representan las regiones no traducidas (UTR). El sitio pronosticado para la escisión de la peptidasa señal está marcado por medio de una punta de flecha y se obtuvo de acuerdo con el servidor Red Informática Mundial SignalIP en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP>. El algoritmo de predicción de dominios transmembrana es descrito por Tusnady et al., 1998. SP, péptido señal; EC, dominio extracelular; Ig, de tipo inmunoglobulina; TM, dominio transmembrana; CIT, dominio citoplásmico; A(n), cola poli A; GPI, glicofosfatidil inositol. En la (Fig. 9A), las flechas en la UTR 3' indican diferentes sitios de adición de poliadenilación utilizados en el ADNc de *IRTA1*. En la (Fig. 9B), se somborean de manera diferente las regiones UTR 3' de las isoformas de *IRTA2*. Las barras debajo de las regiones UTR en la (Fig. 9A) y la (Fig. 9B) identifican las sondas utilizadas para el análisis de transferencia Northern en la Figura 12.

Figuras 10A-10B.

Comparación de las secuencias de aminoácidos de *IRTA1* e *IRTA2* con miembros de la familia de receptores de Fc Fig. 10A) Alineamiento de secuencias múltiples de los dos primeros (arriba) y el tercero (abajo) dominios extracelulares para Ig de *IRTA1* e *IRTA2* para los miembros de la familia de receptores de Fc. Las secuencias se compararon utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los recuadros sombreados de color negro indican aminoácidos conservados entre todas las secuencias; los recuadros sombreados de color gris oscuro indican aminoácidos conservados entre al menos la mitad de las secuencias; los recuadros sombreados de color claro indican las sustituciones conservativas. Fig. 10B) Alineamiento de los dominios de unión a SH2 de *IRTA1* e *IRTA2* con los motivos de consenso ITAM e ITIM. Las posiciones de aminoácidos conservados están en negrita. El símbolo X representa cualquier aminoácido.

Figuras 11A-11B-4.

Patrón de expresión de *IRTA1*. Fig. 11A) Panel izquierdo. Análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de *IRTA1* en tejidos del sistema inmunitario humano. Cada calle contiene 2 mg de ARNm. La posición de los marcadores de peso molecular de ARN se representa en el lado derecho de la transferencia. Las posiciones de los transcritos de ARNm de *IRTA1* y *GAPDH* se muestran por medio de flechas. (Se incluyó una sonda de *GAPDH* en la hibridación como un control interno - sonda marcada 0,15 ng + no marcada 50 ng). Panel derecho. Análisis de transferencia Northern de la expresión de *IRTA1* en el ARN total de la línea celular ER/EB (10 mg por calle). Para este experimento, las células fueron cultivadas en presencia de estrógeno (1 mg/ml), seguido de la retirada de estrógeno durante los momentos indicados. Las flechas indican las posiciones de los ARNm correspondientes. a, b y c corresponden a especies poliadeniladas diferencialmente de *IRTA1*. La misma transferencia se eliminó y se volvió a sondear con una sonda de ADNc MYC (exón 2) para verificar la detención de G₀/G₁ celular. El análisis densitométrico de los niveles de ARNm de *IRTA1* se representa en el gráfico de columnas adyacente. La sonda de ADNc utilizada se muestra como una barra continua por debajo del esquema de ARNm de *IRTA1* en la Figura 9A. Fig.11B-1-11B-4) Análisis de hibridación *in situ* de la expresión de *IRTA1* en secciones seriadas de amígdala humana. 1. Sonda *IRTA1* efectora 2. Sonda *IRTA1* antisentido 3. Tinción H & E 4. Señal *IRTA1* antisentido superpuesta sobre una sección teñida con H & E. GC, centro germinal, MargZ, zona marginal

Figura 12A-12B-4.

Patrón de expresión de *IRTA2*. Fig. 12A) Análisis de transferencia Northern de la expresión de ARNm de *IRTA2* en múltiples tejidos humanos (panel izquierdo) y en diversas líneas celulares linfoides y no linfoides (panel derecho). Cada calle contiene 2 mg de ARNm. Las posiciones de los transcritos de *IRTA2* y *GAPDH* se muestran por medio de flechas. a, b, c y d corresponden a isoformas de ARNm de *IRTA2* de corte y empalme alternativo. RD, NC42 y CB33, líneas de células B linfoblastoides transformadas con virus de Epstein-Barr; EREB, línea celular linfoblastoide B transformada con EBV condicional; FR4, línea de células de plasma; MOLT4 y HUT78, líneas de células T; HL60 y U937, líneas de células mielomonocíticas; K562, línea celular eritroide. La sonda de ADNc utilizada se muestra como una barra continua debajo del esquema del ARNm de *IRTA2* en la Figura 9B. Figs.12B-1-12B-4) Análisis de hibridación *in situ* de la expresión de *IRTA2* en la amígdala humana. Fig. 12B-1. Sonda de ADNc de *IRTA2* efectora, Fig. 12B-2. Sonda de ADNc de *IRTA2* antisentido, Fig. 12B-3. Tinción H & E, Fig. 12B-4. Señal de la sonda de ADNc de *IRTA2* antisentido superpuesta sobre la sección teñida con H & E. GC, centro germinal, MargZ, zona marginal

Figura 13.

Mapa de la región 1q21 de la línea germinal que abarca el punto de rotura FR4 y la organización genómica de *IRTA1* e *IRTA2*. Los cebadores utilizados para amplificar los exones de *IRTA1* a partir de ADNc de bazo están

marcados por medio de puntas de flecha en el panel superior. Los recuadros de color negro y claro indican exones codificantes y no codificantes respectivamente. Las flechas indican la posición de *BCL9*, *MUC1*, familia *IRTA* y *FCGR1B*. loci. S, SacI; H, HindIII; S, SmaI; P, PstI; Mb, Megabases

Figuras 14A-14D.

t(1;14)(q21;q32) en FR4 genera un transcrito de fusión *IRTA1/Cα*. Fig. 14A) Representación esquemática del clon genómico der(14) 1FR4B-5 y del locus *IgCα* de la línea germinal. El punto de rotura FR4 está marcado por una flecha. Los recuadros rellenos y vacíos representan los exones codificantes y no codificantes de *IRTA1* y *Cα*, respectivamente. Fig. 14B) El análisis de transferencia Northern con una sonda del exón 1 de *IRTA1* (que se muestra por medio de una barra en la Fig. 14A) sobre FR4 y otras líneas celulares detecta un mensaje anormal en FR4. Las puntas de flecha apuntan a la ubicación del mensaje de *IRTA1* normal en el ARNm de ER/EB. JJN3 y U266, líneas celulares de mieloma. Se cargaron dos mg de ARN poliA+ por calle. Fig. 14C) Representación esquemática del ADN de fusión *IRTA1/Cα* en FR4. El ADNc se amplificó por RT-PCR a partir de ARN total de FR4 utilizando los cebadores mostrados en la (Fig.14A), y se secuenció después de la subclonación. Fig. 14D) Análisis SDS/PAGE de los productos inmunoprecipitados obtenidos a partir de células 293-T' transfectadas con control de vector y transfectadas con constructos de expresión transitoria de *IRTA1/cα* (calles 1 y 2), o las siguientes líneas celulares: línea de células linfoblastoides positiva para mIgA Dakiki (calle 3), FR4 (calle 4), línea de células NHL positivas para mIgM Ramos (calle 5). H, HindIII; B, BamHI; X, XhoI; Sa, región de cambio de IgA; EC, región extracelular; TM, transmembrana; CIT, citoplasmática.

Figuras 15A-15B.

La expresión de *IRTA2* está desregulada en líneas celulares que portan anomalías 1q21. Figs. 15A, 15B) análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de *IRTA2* en líneas celulares de linfoma de Burkitt (Fig. 15A) y mieloma múltiple (Fig.15B). La sonda de ADNc utilizada es la misma que en la Fig. 12. Cada calle contiene 2 mg de ARNm. Las posiciones de los transcritos de ARNm de *IRTA2* y *GAPDH* se muestran por medio de guiones y flechas, respectivamente. Los niveles relativos de expresión de ARNm de *IRTA2* en el panel de la izquierda (Fig. 15A) se representaron en el panel de la derecha (Fig. 15A) después de análisis densitométrico y la normalización frente a los niveles de *GAPDH*. El panel de la derecha (Fig. 15B) es un resumen de los resultados del análisis de transferencia Northern.

Figuras 16-1-16-4

Expresión de *IRTA1* en tejido linfóide normal. Se tiñeron secciones incluidas en parafina de amígdala humana normal con los anticuerpos siguientes: Fig. 16-1) Control negativo; Fig. 16-2) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 para detectar las células T; Fig. 16-3) anticuerpo monoclonal de ratón anti-*IRTA1* (mIRTA); Fig. 16-4) anticuerpo policlonal de conejo anti-*IRTA1* (J92884K). Las células positivas para *IRTA1* se encuentran en la región perifolicular e intraepitelial de la amígdala, equivalente a la zona marginal en el bazo.

Figura 17

Expresión de *IRTA1* en un linfoma de células B en Tejido Linfóide Asociado a Mucosa del estómago (MALT). Se tiñó una sección incluida en parafina de un linfoma de células B MALT de estómago con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-*IRTA1* (mIRTA) y se contratiñó con H & E. La mayoría de los linfomas MALT analizados eran positivos para *IRTA1*. Por tanto, este anticuerpo puede ser una herramienta eficaz en el diagnóstico diferencial del linfoma MALT. También se ha demostrado que el anticuerpo contra mIRTA1 es útil en la terapia de este tumor de células B, de manera similar al uso del anticuerpo anti-CD20 (rituximab) en la terapia de los linfomas positivos para CD20 con recaída (Foon K., *Cancer J.* 6: pág. 273).

Figura 18A.

ADNc de *IRTA1* y secuencia de aminoácidos de la proteína *IRTA1* codificada.

Figuras 18B-1-18B-3.

ADNc de *IRTA2* y secuencia de aminoácidos de la proteína *IRTA2* codificada.

Figuras 18C-1-18C-2.

ADNc de *IRTA3* y secuencia de aminoácidos de la proteína *IRTA3* codificada.

Figuras 18D-1-18D-2.

ADNc de *IRTA4* y secuencia de aminoácidos de la proteína *IRTA4* codificada.

Figuras 18E-1-18E-2.

ADNc de *IRTA5* y secuencia de aminoácidos de la proteína *IRTA5* codificada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las siguientes abreviaturas convencionales se utilizan en toda la memoria para indicar nucleótidos específicos: C = citosina; A = adenosina; T = timidina y G = guanosina.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína receptora de inmunoglobulina, Asociada a la Translocación de Receptores de la superfamilia de Inmunoglobulinas, IRTA2.

Según se utiliza en la presente memoria los genes "Asociados a la Translocación de Receptores de Inmunoglobulinas", "IRTA" son moléculas de ácido nucleico que codifican los receptores de la superficie celular novedosos de la superfamilia de inmunoglobulinas en las células B que son importantes en el desarrollo de células B, y cuya expresión anormal, p. ej., expresión desregulada, perturba las respuestas inmunológicas de las células B en la superficie celular y por lo tanto están implicadas en las neoplasias malignas de las células B, incluyendo la linfomagénesis.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas denominadas proteínas "MUM-2" y "MUM-3" en la Primera Serie de Experimentos que ahora se denominan genes "IRTA-1" e "IRTA-2", es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas IRTA-1 e IRTA-2, respectivamente. Las proteínas IRTA-3, 4 y 5 son miembros de la misma la superfamilia de genes de inmunoglobulina como son las proteínas IRTA-1 e IRTA-2.

En una realización de la molécula de ácido nucleico aislada descrita anteriormente, la proteína IRTA codificada es la proteína IRTA2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3 (SEQ ID NO: 3).

En otra realización de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas anteriormente, la molécula de ácido nucleico es ADN. En realizaciones adicionales, el ADN es ADNc. En realizaciones adicionales, el ADN es ADN genómico. En otra realización, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN.

En realizaciones preferidas de la molécula de ácido nucleico aislada, las moléculas de ácido nucleico codifican la proteína IRTA2 humana.

En otra realización preferida, las moléculas aisladas de ácido nucleico están unidas operativamente a un promotor de la transcripción de ADN. En otra realización preferida más de la molécula de ácido nucleico aislada, el promotor comprende un promotor bacteriano, de levadura, de insectos, de planta o de mamífero.

Esta invención proporciona un vector que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas anteriormente que codifican la proteína IRTA2, incluyendo pero no limitada a la proteína IRTA2 de mamífero, de las cuales se prefieren la humana y la murina.

En una realización, el vector es un plásmido.

Esta invención proporciona una célula anfitriona que comprende el vector descrito anteriormente que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas anteriormente que codifican la proteína IRTA2. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico aisladas en tales vectores están unidas operativamente a un promotor de la transcripción de ADN. En otra realización de la célula anfitriona, se selecciona la célula de un grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula vegetal, y una célula de insecto y una célula de mamífero.

Se describe un método para producir un polipéptido (proteína) IRTA que comprende: (a) introducir un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína receptora de inmunoglobulina, Asociada a la Translocación de Receptores de la superfamilia de Inmunoglobulinas, IRTA, en una célula anfitriona adecuada; y (b) cultivar la célula resultante con el fin de producir el polipéptido.

La proteína IRTA producida por el método descrito anteriormente puede ser recuperada y en otra realización más, puede ser purificada total o parcialmente. En una realización, la proteína IRTA es IRTA2.

En una realización adicional, las proteínas IRTA2; pueden ser una proteína de mamífero. En otras realizaciones adicionales, la proteína de mamífero puede ser una proteína IRTA2 humana o de ratón.

Los genes IRTA (moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas IRTA IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4 e IRTA5) son útiles para la producción de las proteínas IRTA codificadas de ese modo. Las proteínas IRTA son útiles para la producción de anticuerpos; tales anticuerpos se utilizan como reactivos para el diagnóstico diferencial de los subtipos de linfoma en hematopatología. Los anticuerpos dirigidos contra las proteínas IRTA y que se unen específicamente a las proteínas IRTA también tienen usos terapéuticos, es decir, para dirigirse específicamente a las células tumorales, que pueden ser utilizados y administrados de manera similar a "Rituximab" (un anticuerpo anti-CD20), que es un anticuerpo aprobado por la FDA para el tratamiento de los linfomas positivos para CD20 con recaída (Foon K., Cancer J. 6 (5):273). Los anticuerpos anti-IRTA1, anti-IRTA2, anti-IRTA3, anti-IRTA4 y anti-IRTA5 también son marcadores útiles para el aislamiento de subconjuntos específicos de células B en estudios de investigación de la biología de células B normales y tumorales. Por otra parte, los anticuerpos anti-IRTA1, anti-IRTA2, anti-IRTA3, anti-IRTA4 y anti-IRTA5 son reactivos de investigación útiles para estudiar experimentalmente la biología de señalización en las células B normales y tumorales.

Los métodos para introducir moléculas de ácido nucleico en células son bien conocidos para los expertos en la

técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, el uso de vectores virales y la co-precipitación con fosfato de calcio. Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas IRTA IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4 e IRTA5 se pueden introducir en las células para la producción de estas proteínas IRTA.

Se pueden emplear numerosos vectores para la expresión de las proteínas de la invención IRTA2. Tales vectores, incluyendo los vectores plasmídicos, los vectores cósmidos, los vectores de bacteriófagos y otros virus, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una clase de vectores utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus de polio, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MoMLV), virus del bosque Semliki o virus SV40. Adicionalmente, las células que han integrado de forma estable el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células anfitrionas transfectadas. Los marcadores pueden proporcionar, por ejemplo, prototrofia a un anfitrión auxótrofo, resistencia a biocidas o resistencia a metales pesados tales como el cobre. El gen marcador seleccionable puede ser directamente ligado a las secuencias de ADN que se van a expresar, o puede ser introducido en la misma célula por medio de transformación simultánea.

Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras que se van a unir a ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para la unión al ribosoma. También se pueden necesitar elementos adicionales para la síntesis óptima del ARNm. Estos elementos adicionales pueden incluir señales de empalme, así como potenciadores y señales de terminación. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano incluye un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la transcripción la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG. De un modo similar, un vector de expresión eucariótico incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación aguas abajo, el codón de inicio AUG, y un codón de terminación para la separación del ribosoma. Tales vectores se pueden obtener comercialmente o se pueden ensamblar a partir de las secuencias descritas por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo los métodos descritos anteriormente para construir vectores en general.

Estos vectores se pueden introducir en una célula anfitriona adecuada para formar un sistema vector anfitrión para producir las proteínas de la invención. Los métodos de elaboración de sistemas de vectores anfitriones son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las células anfitrionas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas (incluyendo células Gram positivas), células de levadura, células fúngicas, células de insecto y células animales. Las células animales adecuadas incluyen, pero no se limitan a células HeLa, células Cos, células CV1 y diversas células de mamíferos primarias. Se pueden utilizar numerosas células de mamíferos como anfitriones, incluyendo, pero no limitadas a, fibroblastos de ratón, células NIH-3T3, células CHO, células HeLa, células Ltk y células COS. Las células de mamíferos pueden ser transfectadas por métodos bien conocidos en la técnica tales como precipitación con fosfato cálcico, electroporación y microinyección.

Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos capaces de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína IRTA2, o uno o varios fragmentos de la misma, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 18A. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas se marcan con un marcador detectable. En otras realizaciones adicionales de las moléculas de ácido nucleico aisladas, el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, enzima, colorante, biotina, una marca fluorescente o una marca quimioluminiscente.

Esta invención proporciona un método para detectar una neoplasia maligna de las células B o un tipo de neoplasia maligna de las células B en una muestra de un sujeto en donde la neoplasia maligna de las células B comprende una reordenación cromosómica 1q21, que comprende:

- a) poner en contacto la muestra de ARN obtenida del sujeto con la molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos contiguos capaces de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica la proteína IRTA2 humana en condiciones que permiten la hibridación del ARN de la etapa (a) con la molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica la proteína IRTA2 humana, en donde la molécula de ácido nucleico está marcada con un marcador detectable; y b) detectar cualquier hibridación en la etapa (a) en donde la detección de hibridación indica la presencia de neoplasia maligna de las células B o un tipo de neoplasia maligna de las células B en la muestra.

La detección de la hibridación de ARN que codifica las proteínas IRTA indicará que una neoplasia maligna es una neoplasia maligna de las células B. Más específicamente, la detección de hibridación del ARN que codifica la proteína IRTA1 indica que la neoplasia maligna de células B es un linfoma de células B de Tejido Linfóide Asociado a la Mucosa (MALT). La detección de hibridación de ARN que codifica las proteínas IRTA4 e IRTA5 indica que la neoplasia maligna de las células B es un linfoma de células del manto. En una realización del método descrito anteriormente, la neoplasia maligna de células B comprende una reordenación cromosómica 1q21. Un experto utilizará el método descrito anteriormente como ayuda para el diagnóstico junto con otros métodos convencionales

de detección/diagnóstico de neoplasias malignas, p. ej., patología de una muestra de tumor, que puede indicar linfoma y a continuación el método descrito anteriormente, restringirá la neoplasia maligna a un linfoma de células B o más específicamente a un linfoma de células B MALT) o un linfoma de células del manto como se ha discutido anteriormente.

Un experto en la técnica está familiarizado con los métodos conocidos de detección de hibridación de moléculas de ácido nucleico con oligonucleótidos de ácido nucleico, es decir, sondas de ácido nucleico que codifican una proteína de interés para métodos de diagnóstico. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas IRTA de la presente invención son útiles para detectar neoplasias malignas de las células B. Un experto en la técnica reconocerá que las variaciones del método descrito anteriormente para la detección de una neoplasia maligna de las células B en una muestra incluyen, pero no se limitan a, digestión del ácido nucleico de la muestra con enzimas de restricción y separación de los fragmentos de la molécula de ácido nucleico así obtenidos por medio de fraccionamiento por tamaños antes de la hibridación.

En una realización del método descrito anteriormente para la detección de una neoplasia maligna de células B en una muestra de un sujeto, el marcador detectable es un isótopo radiactivo, una enzima, un colorante, biotina, una marca fluorescente o una marca quimioluminiscente. En una realización preferida, la neoplasia maligna de células B se selecciona del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma de las células foliculares. En una realización adicional, el linfoma de células B es linfoma de células B del Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En otra realización preferida, el linfoma de células B es linfoma no Hodgkin.

Esta invención proporciona un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar la expresión en exceso de la molécula de ARNm.

En una realización preferida del oligonucleótido antisentido, la proteína IRTA es IRTA2 humana. En una realización adicional de cualquiera de los oligonucleótidos de moléculas de ácido nucleico descritos anteriormente que codifican la proteína IRTA2, el ácido nucleico puede ser ADN genómico o ADNc.

Un experto en la técnica está familiarizado con los mecanismos convencionales para la hibridación de ácido nucleico de oligonucleótidos, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Nueva York, 1998), por ejemplo condiciones restrictivas de 65°C en presencia de una concentración de sal elevada. Tales condiciones se utilizan para la hibridación de ácido nucleico completamente complementario, mientras que las condiciones que no son restrictivas se utilizan para la hibridación de ácidos nucleicos que no son totalmente complementarios.

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "hibridar específicamente" representa la capacidad de una molécula de ácido nucleico para reconocer una secuencia de ácido nucleico complementaria a ella misma y para formar segmentos de doble hélice mediante enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Según se utiliza en la presente memoria, una "secuencia única" es una secuencia específica sólo para las moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína IRTA2. La tecnología de sondas de ácido nucleico es bien conocida para los expertos en la técnica que apreciarán fácilmente que tales sondas pueden variar mucho de longitud y pueden estar marcadas con una marca detectable, tal como un radioisótopo o colorante fluorescente, para facilitar la detección de la sonda. La detección de moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína IRTA2 es útil como prueba de diagnóstico para cualquier proceso de enfermedad en el que los niveles de expresión de la proteína IRTA2 correspondiente están alterados. Las moléculas de sonda de ADN se producen mediante la inserción de una molécula de ADN que codifica la proteína IRTA2 de mamífero o sus fragmentos en vectores adecuados, tales como plásmidos o bacteriófagos, seguido de la inserción en las células anfitrionas bacterianas adecuadas y la replicación y la recolección de las sondas de ADN, todo ello utilizando bien los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ADN puede ser extraído de un producto lisado celular utilizando fenol y etanol, digerido con las enzimas de restricción correspondientes a los sitios de inserción del ADN en el vector (comentado en la presente memoria), sometido a electroforesis, y separado por corte del gel resultante. Las sondas de oligonucleótidos son útiles para la hibridación 'in situ' o con el fin de localizar tejidos que expresan esta familia de genes IRTA, y para otros análisis de hibridación para determinar la presencia de estos genes (moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas IRTA2) o su ARNm en diversos tejidos biológicos. Adicionalmente, los oligonucleótidos sintetizados (producidos por un sintetizador de ADN) complementarios a la secuencia de una molécula de ADN que codifica una proteína IRTA2 son útiles como sondas para estos genes, para su ARNm asociado, o para el aislamiento de genes relacionados por escrutinio de homología de bibliotecas genómicas o de ADNc, o mediante el uso de técnicas de amplificación tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Esta invención proporciona una proteína IRTA2 purificada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3 (SEQ ID NO: 3). En una realización de la proteína IRTA2 purificada, la proteína IRTA2 es IRTA2 humana.

Con el fin de facilitar la comprensión de la sección de Detalles Experimentales siguiente, ciertos métodos y/o

términos que aparecen con frecuencia se describen mejor en Sambrook, et al. (1989) y Harlow y Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York: 1988.

Esta invención proporciona uno o varios anticuerpos dirigidos a un epítipo de proteína IRTA2 purificada, o uno o varios fragmentos de los mismos, que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural. Específicamente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos de unión de los mismos. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos y anticuerpos completamente sintéticos, y fragmentos de los mismos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales pueden ser "purificados", lo que significa que los anticuerpos policlonales y monoclonales están libres de cualquier otro anticuerpo. Según se utiliza en la presente memoria, anticuerpo parcialmente purificado significa una composición de anticuerpos que comprende anticuerpos que se unen específicamente a la proteína IRTA de la invención sujeto, y consta de menos impurezas de proteína que el suero del cual derivan los anticuerpos. Una impureza de proteína es una proteína distinta de los anticuerpos específicos para la proteína IRTA de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos parcialmente purificados pueden ser una preparación de IgG.

Los anticuerpos policlonales (anticuerpos anti-IRTA) se pueden producir mediante la inyección a un animal anfitrión tal como un conejo, rata, cabra, ratón u otro animal del inmunógeno o los inmunógenos de esta invención, por ejemplo, una IRTA1 humana purificada descrita más abajo. Los sueros se extraen del animal anfitrión y se escrutan para obtener anticuerpos policlonales que son específicos para el inmunógeno. Los métodos de escrutinio de anticuerpos policlonales son bien conocidos para los expertos normales en la técnica tales como los descritos en Harlow y Lane Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York: 1988)

Los anticuerpos monoclonales anti-IRTA de la presente invención pueden ser producidos mediante la inmunización, por ejemplo, de ratones con un inmunógeno (los polipéptidos IRTA o fragmentos de los mismos descritos en la presente memoria). A los ratones se les inocula por vía intraperitoneal una cantidad inmunogénica del inmunógeno descrito anteriormente y a continuación se refuerza con cantidades similares de inmunógeno. Se recogen los bazos de los ratones inmunizados unos pocos días después del refuerzo final y se prepara una suspensión de células a partir de los bazos para su uso en la fusión.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de los esplenocitos y un compañero tumoral murino utilizando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497. Se pueden utilizar en la hibridación las líneas de mieloma murino disponibles, tales como las de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Básicamente, la técnica implica la fusión de las células tumorales y los esplenocitos utilizando un fusógeno tal como polietilenglicol. Después de la fusión las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio HAT, para eliminar células parentales no hibridadas. Los hibridomas se pueden expandir, si se desea, y los sobrenadantes se pueden analizar por procedimientos de inmunoanálisis convencionales, por ejemplo radioinmunoanálisis, utilizando el agente inmunizante como antígeno. Los clones positivos se pueden caracterizar adicionalmente para determinar si satisfacen los criterios de los anticuerpos de la invención.

Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden hacer crecer *in vitro* o *in vivo* utilizando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar de los medios de cultivo o de los fluidos corporales, según corresponda, por medio de procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea.

En la práctica de la presente invención cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente se puede marcar con un marcador detectable. En una realización, el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado purificado. El término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos tanto naturales como no naturales. Específicamente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos de los mismos. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos y anticuerpos completamente sintéticos, y fragmentos de los mismos. Los "radicales detectables" que funcionan como marcas detectables son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, una marca fluorescente, un átomo radiactivo, un ion paramagnético, biotina, una marca quimioluminiscente o una marca que se puede detectar a través de una etapa enzimática secundaria o de unión. La etapa enzimática secundaria o de unión puede comprender el uso de digoxigenina, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, fluoresceína o estreptavidina/biotina. Los métodos de marcaje de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Los métodos de recuperación de suero de un sujeto son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación parcial de anticuerpos también son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, a modo de ejemplo, filtración, cromatografía de intercambio iónico, y precipitación.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales de la invención se pueden marcar con un marcador detectable. En una realización, el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado purificado. El marcador detectable puede ser, por

ejemplo, un marcador radiactivo o fluorescente. Los métodos de marcaje de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

La determinación de si los anticuerpos policlonales y monoclonales de la presente invención se unen a las células, por ejemplo, células cancerosas, que expresan una proteína IRTA y forman un complejo con una o más de las proteínas IRTA descritas en la presente memoria, o fragmentos de las mismas, en la superficie de dichas células, se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En la realización preferida, la determinación se lleva a cabo de acuerdo con métodos de citometría de flujo.

Los anticuerpos de la presente invención pueden estar unidos a una matriz insoluble tal como la utilizada en la cromatografía de afinidad. Las células que forman un complejo, es decir, se unen, con el anticuerpo policlonal o monoclonal inmovilizado se pueden aislar por medio de métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el aislamiento puede comprender cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo inmovilizado.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo libre. En este caso, el aislamiento puede comprender la clasificación de células utilizando anticuerpos primarios o secundarios marcados. Tales métodos de clasificación de células son convencionales y son bien conocidos para los expertos en la técnica.

Esta invención proporciona un anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 purificada. En una realización preferida del anticuerpo anti-IRTA, la proteína IRTA es una proteína IRTA humana. La proteína IRTA puede ser cualquier proteína IRTA de mamífero, incluyendo una proteína IRTA murina. En una realización adicional de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo monoclonal humanizado. Según se utiliza en la presente memoria, "humanizado" representa un anticuerpo que tiene características de un anticuerpo humano, siendo dicho anticuerpo de origen no natural, pero creado utilizando técnicas de hibridoma en las que el anticuerpo es de origen humano, excepto para la porción determinante antigénica, que es murina. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

En realizaciones preferidas, cualquiera de los anticuerpos de la presente invención se puede conjugar con un agente terapéutico. En otras realizaciones preferidas, el agente terapéutico es un radioisótopo, una toxina, un toxoide o un agente quimioterapéutico. Los anticuerpos conjugados de la presente invención se pueden administrar a un sujeto que tiene un cáncer de células B mediante cualquiera de los métodos proporcionados a continuación.

Esta invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad del anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA2 seleccionada del grupo formado por humanos con el fin de prevenir el crecimiento de las células cancerosas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo anti-IRTA puede estar dirigido a un epítipo de una proteína IRTA2. Las proteínas pueden ser proteínas IRTA humanas o IRTA de ratón.

En realizaciones preferidas de la composición farmacéutica descrita anteriormente, las células cancerosas se seleccionan del grupo que consiste en células de linfoma de células B, de mieloma múltiple, de linfoma de células del manto, de linfoma de Burkitt, de linfoma de la zona marginal, de linfoma difuso de células grandes y de linfoma folicular. En otra realización preferida de la composición farmacéutica, las células de linfoma de células B son células de linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En otra realización preferida de la composición farmacéutica, las células de linfoma de células B son células de linfoma no Hodgkin. Esta invención proporciona, tal como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de cualquiera de los oligonucleótidos descritos anteriormente eficaz para prevenir la expresión en exceso de una proteína IRTA humana y un portador farmacéuticamente aceptable idóneo. En realizaciones preferidas de la composición farmacéutica el oligonucleótido es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína IRTA2.

La proteína IRTA puede ser una proteína IRTA humana o de ratón.

Según se utiliza en la presente memoria, "neoplasia maligna" significa susceptible de metastatizar. Según se utiliza en la presente memoria, "células tumorales" son las células que se originan a partir de un tumor, es decir, a partir de un nuevo crecimiento de tejido diferente o anormal. Las células tumorales y las células cancerosas pueden existir como parte de la masa tumoral, o pueden existir como células que flotan libremente, desprendidas de la masa tumoral a partir de la cual se originan.

Según se utiliza en la presente memoria, las células malignas incluyen, pero no se limitan en modo alguno a, linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma folicular. El linfoma de células B es linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT) o es linfoma no Hodgkin.

Según se utiliza en la presente memoria, "sujeto" es cualquier animal o animal modificado artificialmente. Los animales modificados artificialmente incluyen, pero no se limitan a, ratones SCID con sistemas inmunitarios

humanos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Esta invención proporciona un método de diagnóstico de neoplasia maligna de células B que comprende una reordenación cromosómica 1q21 en una muestra de un sujeto que comprende:

- a) poner en contacto la muestra obtenida del sujeto con un anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 purificada capaz de unirse específicamente con una proteína IRTA2 humana sobre una superficie celular de una célula cancerosa en condiciones que permiten la unión del anticuerpo con la proteína IRTA2 humana sobre la superficie celular de la célula cancerosa, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable; y
- b) detectar cualquier unión en la etapa (a), en donde la detección de unión indica un diagnóstico de neoplasia maligna de células B en la muestra.

En una realización del método de diagnóstico descrito anteriormente de neoplasia maligna de células B, la proteína IRTA es IRTA2.

En otra realización del método, la proteína IRTA es la proteína IRTA humana o de ratón. En una realización adicional la proteína IRTA es purificada. En una realización preferida de este método, la neoplasia maligna de células B se selecciona entre el grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma folicular. En otra realización más de este método, el linfoma de células B es linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En otra realización preferida de este método, el linfoma de células B es linfoma no Hodgkin.

Se describe un método para detectar la proteína IRTA humana en una muestra que comprende: a) poner en contacto la muestra con cualquiera de los anticuerpos anti-IRTA descritos anteriormente bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la IRTA en la muestra; y b) detectar el complejo formado en la etapa (a), detectando de ese modo la presencia de IRTA humana en la muestra. En una realización la proteína IRTA detectada puede ser una proteína IRTA2, que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3. Como se ha descrito anteriormente en este documento, la detección del complejo formado se puede conseguir mediante el uso de anticuerpos marcados con un marcador detectable y la determinación de la presencia del complejo marcado.

La detección de la proteína IRTA humana en una muestra de un sujeto es otro método de diagnóstico de neoplasia maligna de células B en un sujeto. En una realización de este método de diagnóstico, la neoplasia maligna de células B se selecciona del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma folicular. En otra realización adicional de este método, el linfoma de células B es linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En otra realización preferida de este método, el linfoma de células B es linfoma no Hodgkin.

Esta invención proporciona la utilización de un tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B, que comprende administrar al sujeto una cantidad de anticuerpo anti-IRTA eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA con el fin de evitar el crecimiento de las células cancerosas y un portador farmacéuticamente aceptable, tratando de este modo al sujeto. El crecimiento y la proliferación de las células cancerosas es inhibido de ese modo y las células cancerosas mueren. En una realización de la utilización anteriormente descrita, la proteína IRTA es IRTA2 humana.

En una realización preferida de la utilización descrita anteriormente de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B, el anticuerpo anti-IRTA es un anticuerpo monoclonal. En otra realización del método, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo monoclonal humanizado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. En una realización adicional, el anticuerpo anti-IRTA es un anticuerpo policlonal. En una realización, el anticuerpo policlonal puede ser un anticuerpo policlonal murino o humano. En una realización preferida, el cáncer de células B se selecciona del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma folicular. En otra realización preferida, el linfoma de células B es linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En una realización preferida adicional, el linfoma de células B es linfoma no Hodgkin. En una realización preferida del método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B descrito anteriormente, la administración de la cantidad de anticuerpo anti-IRTA eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA es mediante liberación intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intramuscular, intralesional, parenteral, epidural, subcutánea; por infusión, por medio de liberación mediada por liposomas, liberación en aerosol; tópica, oral, nasal, anal, ocular u ótica. En otra realización preferida de los métodos descritos anteriormente, el anticuerpo anti-IRTA se puede conjugar con un agente terapéutico. En otras realizaciones preferidas, el agente terapéutico es un radioisótopo, una toxina, un toxoide o un agente quimioterapéutico.

Esta invención proporciona una utilización para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de células B, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar la expresión en exceso de la proteína IRTA2 humana, con el fin de detener el crecimiento celular o de inducir la muerte

celular de las células cancerosas que expresan la proteína o las proteínas IRTA y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la utilización descrita anteriormente para el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer de células B, la proteína IRTA es la proteína IRTA2 humana. En una realización preferida, el cáncer de células B se selecciona del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de células grandes y linfoma folicular. En otra realización preferida, el linfoma de células B es linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT). En otra realización preferida más, el linfoma de células B es linfoma no Hodgkin. En realizaciones de cualquiera de los oligonucleótidos descritos anteriormente de moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína IRTA2, el ácido nucleico puede ser ADN genómico o ADNc. En una realización adicional preferida del uso descrito anteriormente para tratar un sujeto que tiene un cáncer de células B, la administración de la cantidad de oligonucleótido eficaz para prevenir la expresión en exceso de la proteína IRTA humana mediante liberación es intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intramuscular, intralesional, parenteral, epidural, subcutánea; por infusión, mediante liberación mediada por liposomas, liberación en aerosol; tópica, oral, nasal, anal, ocular u ótica. En una realización de los métodos descritos anteriormente, el oligonucleótido se puede conjugar con un agente terapéutico. En otras realizaciones preferidas, el agente terapéutico es un radioisótopo, una toxina, un toxoide o un agente quimioterapéutico.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de los oligonucleótidos o de los anticuerpos descritos anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. En la invención sujeto una "cantidad eficaz" es cualquier cantidad de un oligonucleótido o un anticuerpo que, cuando se administra a un sujeto que padece una enfermedad o anomalía contra las que el oligonucleótido o anticuerpo son eficaces, causa una reducción, remisión o regresión de la enfermedad o anomalía. En la práctica de esta invención, el "portador farmacéuticamente aceptable" es cualquier portador fisiológico conocido para los expertos normales en la técnica útil en la formulación de composiciones farmacéuticas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los portadores parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer con lactato añadido o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y reponedores de nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

En una realización preferida, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica estaría en forma de una solución. En otra realización igualmente preferida, el portador farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en la forma de un polvo o un comprimido. En una realización adicional, el portador farmacéutico es un gel y la composición está en forma de un supositorio o una crema. En una realización adicional, el compuesto se puede formular como parte de un parche transdérmico farmacéuticamente aceptable.

Un portador sólido puede incluir una o más sustancias que también pueden actuar como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, antiapelmazantes, coadyuvantes de compresión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material encapsulante. En los polvos, el portador es un sólido finamente dividido que está mezclado con el ingrediente activo finamente dividido. En los comprimidos, el ingrediente activo se mezcla con un portador que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y el tamaño deseados. Los polvos y los comprimidos contienen preferiblemente hasta 99% del ingrediente activo. Los portadores sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.

Los portadores líquidos se utilizan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El ingrediente activo se puede disolver o suspender en un portador líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de portadores líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos como los anteriores, p. ej., derivados de celulosa, preferentemente solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohidroxilados y alcoholes polihidroxilados, p. ej. glicoles) y sus derivados, y aceites (p. ej., aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para la administración parenteral, el portador también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los portadores líquidos estériles son útiles en composiciones estériles en forma líquida para la administración parenteral.

El portador líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal o subcutánea. Las soluciones estériles también se pueden administrar por vía intravenosa. Los compuestos se pueden preparar como una composición sólida estéril que se puede disolver o suspender en el momento de la administración utilizando agua estéril, solución salina, u otro medio inyectable estéril apropiado. Se pretende que los portadores incluyan los aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, colorantes, y recubrimientos necesarios e inertes.

La composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido o el anticuerpo se puede administrar oralmente en forma de una solución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión, por ejemplo, suficiente solución salina o glucosa para hacer la solución isotónica, sales biliares, acacia, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares.

La composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido o el anticuerpo también se puede administrar por vía oral en forma de una composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos, y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires, y suspensiones. Las formas útiles para la administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones, y suspensiones estériles.

Las dosificaciones óptimas que se van a administrar pueden ser determinadas por los expertos en la técnica, y variarán con el inhibidor concreto en uso, la fuerza de la preparación, el modo de administración, y el progreso del estado de enfermedad o anomalía. Otros factores que dependen del sujeto concreto a tratar darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones, incluyendo la edad del sujeto, el peso, el sexo, la dieta y el tiempo de administración.

Esta invención se entenderá mejor a partir de los Detalles Experimentales siguientes. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos comentados son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones siguientes.

DETALLES EXPERIMENTALES

Primera serie de experimentos

El análisis molecular de las translocaciones cromosómicas asociadas con el mieloma múltiple (MM) ha indicado que la patogénesis de esta neoplasia maligna puede ser heterogénea, estando asociada con varios oncogenes distintos incluyendo BCL-1, MUM-1 y FGFR3. Las anomalías estructurales del cromosoma 1q21, incluyendo las translocaciones con el cromosoma 14q32, representan aberraciones citogenéticas frecuentes asociadas con el mieloma múltiple. Con el fin de identificar los genes implicados en estas translocaciones, se clonaron las regiones del punto de rotura correspondientes a ambos derivados de una t(1;14)(q21;q32) detectable en la línea celular de plasmacitoma humano FR4. El análisis de las secuencias del punto de rotura mostró que implicaban una recombinación recíproca entre el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) en 14q32 y secuencias desconocidas en 1q21. El locus normal correspondiente a la región 1q21 implicada en la translocación se clonó y se identificaron los genes adyacentes a la región del punto de rotura por medio de una estrategia de captura del exón. Se encontraron dos genes, localizados a una distancia de 20 Kb entre sí, en la región que abarcaba el punto de rotura en 1q21. El primer gen, denominado MUM-2 (mieloma múltiple 2) se expresa como un transcrito de ARNm de 2,5 Kb detectable en el bazo y los ganglios linfáticos. La clonación y secuenciación del ADNc de MUM-2 completo pronostica una glicoproteína de la superficie celular de 515 aminoácidos que contiene cuatro dominios de tipo Ig extracelulares, uno transmembrana y un dominio citoplasmático y que comparten 37% de identidad (51% de homología) con el receptor I gamma de Fc sobre sus tres primeros dominios extracelulares. En las células FR4, los puntos de rotura de la translocación interrumpen el dominio codificante de MUM-2 y lo yuxtaponen al locus IgH en la misma orientación transcripcional. Como consecuencia, los transcritos MUM-2 específicos de FR4 estructuralmente anormales (3,0, 5,2 y 6,0 Kb) en los ganglios linfáticos y el bazo codifican una proteína con un dominio extracelular que contiene seis dominios de tipo Ig homólogos a los miembros de las familias de receptores Fc gamma y de adherencia de tipo Ig. La estructura de los genes MUM-2 y MUM-3 y su participación directa en una translocación asociada a MM sugieren que estos genes codifican los receptores de la superficie celular novedosos importantes para la función de los linfocitos normales y las neoplasias malignas de las células B.

Segunda serie de experimentos

Procedimientos experimentales

Líneas celulares

Las líneas celulares de MM utilizadas en este estudio (FR4, U266, JJN3, EJM, SKMM1, RPMI-8226, XG1, XG2,

XG4, XG6, XG7) han sido referidas previamente (Tagawa et al., 1990), (Jernberg et al., 1987), (Hamilton et al., 1990; Jackson et al., 1989), (Eton et al., 1989), (Zhang et al., 1994). La línea celular FR4 se estableció en el laboratorio de uno de los autores (S.T.). Las líneas celulares U266, JLN3 y EJM fueron donaciones del Dr. K. Nilsson (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia) y la línea celular SKMM-1 fue una donación A.N. Houghton (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Nueva York, NY). Las cinco líneas de células XG se obtuvieron del Dr. Bernard Klein y se cultivaron en presencia de 1 ng/ml de IL-6 humana recombinante como se ha descrito previamente (Zhang et al., 1994). Las líneas celulares BL con anomalías 1q21 se han descrito previamente (Polito et al., 1995), (Magrath et al., 1980) y se cultivaron en RPMI, FCS al 10%.

Selección de la biblioteca genómica y de ADNc y análisis de la secuencia de ADN

Se construyeron dos bibliotecas genómicas a partir de ADN genómico de FR4 por medio de digestión completa con BamHI o por medio de digestión parcial con Sau3AI y posterior ligación de las fracciones purificadas en gel en el vector de fago 1DASH-II (Stratagene). La biblioteca de BamHI se escrutó con una sonda XhoI-BamHI de 4,2 kb derivada del locus de Ca y la biblioteca Sau3AI se escrutó con una sonda 5'Sa descrita previamente (Bergsagel et al., 1996). Se escrutó una biblioteca de ADN de placenta humana (Stratagene) con una sonda 1.0EH (Figuras 8A-8C) para obtener el locus 1q21 de la línea germinal. El escrutinio de la biblioteca y el aislamiento de la placa se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos (Sambrook et al., 1989). Los clones de ADNc de *IRTA1* e *IRTA2* se aislaron a partir de una biblioteca de ADNc oligo-dT/cebada al azar construida a partir de ARN de bazo humano normal (Clontech). La sonda de ADNc de *IRTA1* utilizada para el escrutinio de la biblioteca se obtuvo a partir de la RT-PCR de ADNc de bazo humano utilizando los cebadores que flanquean los exones 1 y 3. La secuenciación del ADN se llevó a cabo en un secuenciador automatizado ABI 373 (Applied Biosystems). Las búsquedas de homología de secuencia se llevaron a cabo a través del servidor de correo electrónico BLAST en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, Bethesda, MD.

Aislamiento de PAC y YAC y captura de exones

Los clones de PAC humanos se obtuvieron mediante escrutinio de una biblioteca PAC humana aplicada sobre membranas de nailon (Research Genetics), con la sonda de 1,0 EH (Figuras 8A-8C). Se escrutó la biblioteca de YAC humanos Zeneca (antes ICI) (Anand et al., 1990) obtenida del United Kingdom Human Genome Mapping Resource center (UK-HGMP) utilizando una estrategia de agrupamiento basada en la PCR. La captura de exones se realizó utilizando el sistema de captura de exones (Gibco BRL), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de clones finales de PAC/YAC, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y análisis de hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH)

La extracción de ADN de PAC se realizó de acuerdo con los métodos de lisis alcalina convencionales (Drakopoli N et al., 1996). Se utilizó un método de PCR vectorette para aislar sondas terminales de PAC y YAC (Riley et al., 1990), como se ha descrito previamente (Iida et al., 1996). El análisis de PFGE se realizó de acuerdo con protocolos convencionales (Drakopoli N et al., 1996) utilizando el sistema CHEF Mapper (BioRad, Hercules, CA). El marcaje con biotina del ADN de PAC, la preparación de cromosomas y FISH se realizaron como se ha descrito previamente (Rao et al., 1993).

Análisis de transferencia Southern y Northern, RACE y RT-PCR

Los análisis de transferencia Southern y Northern se realizaron como se ha descrito previamente (Neri et al., 1991). Para los análisis de transferencia Northern se preparó el ARN total por el método del tiocianato de guanidinio y se seleccionó el ARN poli(A) utilizando cuentas recubiertas con poli(T) (Kit Oligotex de Quigen). Para las transferencias Northern, se cargaron 2 mg de ARN poli(A) por calle. Se obtuvieron filtros Northern de múltiples tejidos de Clontech. La RACE se realizó utilizando el kit de Amplificación de ADNc Marathon (Clontech) y ADNc de bazo Marathon-Ready. La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando el sistema SuperScript RT-PCR (Gibco BRL).

Hibridación *in situ*

Se transcribieron sondas de ARNc antisentido y efectoras que contenían digoxigenina con ARN polimerasa T3 y T7, respectivamente, a partir de plásmidos pBluescript KS+ linealizados que contenían la región codificante de los ADNc (nucleótidos 62-1681 de *IRTA1* y 18 a 2996 de *IRTA2*.) Se congeló instantáneamente tejido tonsilar humano hiperplásico extirpado quirúrgicamente de niños del Babies Hospital, Columbia Presbyterian Medical Center en hielo seco en polvo. Las secciones del criostato se almacenaron durante varios días a -80 grados C antes del procesamiento. La hibridación no radiactiva *in situ* se realizó esencialmente como se ha descrito (Frank et al., 1999), excepto que el tiempo de fijación en paraformaldehído al 4% se aumentó a 20 minutos, y se omitió el tratamiento con proteinasa K. La rigurosidad de la hibridación fue de 68 grados C, en 5X SSC, formamida al 50%. La tinción de los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina se desarrolló con el sustrato BCIP/NBT.

Transfección, inmunoprecipitación y transferencia Western.

Se transfectaron de manera transitoria células 293 (ATCC), cultivadas en DMEM, FCS al 10%, de acuerdo con el método de fosfato de calcio convencional, con constructos de expresión transitoria pMT2T y pMT2T-*IRTA1*/Ca. Este último fue generado utilizando el producto de la RT-PCR de *IRTA1*/Ca de FR4. Las células (2×10^6 de transfectantes y 2×10^7 de líneas celulares restantes) se solubilizaron en tampón de lisis Triton X-100 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], TX-100 al 1%, BSA al 0,1%) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Biochemicals). Los productos lisados se incubaron a 4°C durante 2 horas con 4 mg/ml del anticuerpo monoclonal

Núm. 117-332-1 (Yu et al., 1990) (Tanox Biosystems, Inc, Houston, Texas) que se originaron contra la porción extracelular del péptido de membrana IgA. Los complejos inmunitarios se aislaron con proteína G-Sepharose (Pharmacia) antes de la electroforesis sobre geles en gradiente al 10-20% de Tris-HCl (BioRad) y de la inmunotransferencia, utilizando 15 mg/ml del anticuerpo Núm. 117-332-1. Los resultados se visualizaron por medio de ECL (Amersham).

RESULTADOS

Clonación Molecular de la t(1;14)(q21;q32)

Las translocaciones cromosómicas que involucran al locus de la cadena pesada de Ig (IGH) se producen a menudo dentro o cerca de regiones de cambio de IgH como resultado de eventos de recombinación de cambio "ilegítimos" (Dalla-Favera et al., 1983; Chesi et al., 1996; Chesi et al., 1998). Los puntos de rotura se pueden detectar mediante análisis de hibridación por transferencia Southern como alelos reordenados en los que las secuencias de la región constante (C_H) de IGH han perdido su asociación sinténica con las secuencias de la región de unión (J_H) de IGH y de cambio 5' (S) (Dalla-Favera et al., 1983; Neri et al., 1988; Neri et al., 1991; Bergsagel et al., 1996). Este análisis ha llevado a la identificación de varios compañeros cromosómicos para el locus IgH en B-NHL y MM (Taub et al., 1982; Dalla-Favera et al., 1983; Neri et al., 1988; Neri et al., 1991; Ye et al., 1993; Chesi et al., 1996; Richelda et al., 1997; Iida et al., 1997; Dyomin et al., 1997; Dyomin et al., 2000). Los autores de la presente invención emplearon la misma estrategia con el fin de clonar la región del punto de rotura de 1q21 en FR4, una línea celular de mieloma que porta una t(1;14)(q21;q32), según lo determinado por análisis citogenético (Tagawa et al., 1990; Taniwaki M, resultados no publicados). Dos "fragmentos ilegítimamente reordenados se identificaron en el locus de la cadena pesada $C\alpha$ en FR4 mediante análisis de transferencia Southern (datos no mostrados), y se clonaron a partir de bibliotecas de fagos construidas a partir de ADN genómico de FR4. El mapeo de restricción, la hibridación por transferencia Southern y la secuenciación de nucleótidos parcial de dos fagos genómicos (clones lambda FR4B-5 y λ FR4S-a, Figura 8A) demostraron que contenían los puntos de rotura cromosómicos de una translocación equilibrada recíproca entre el locus $C\alpha_1$ en 14q32 y secuencias distintas de IGH. A continuación se utilizó una sonda (1.0EH) que representaba estas secuencias distintas de IgH (Figura 8A) para clonar el correspondiente locus genómico normal a partir de bibliotecas genómicas humanas del cromosoma artificial del fago P1 (PAC), y el cromosoma artificial de levadura (YAC). El análisis de hibridación fluorescente in situ (FISH) de las propagaciones de la metafase humana normal utilizando el clon PAC no quimérico de 100 kb 49A16 que abarca la región del punto de rotura (véase más abajo, Figura 13), identificó el locus cromosómico compañero como derivado de la banda 1q21 (Figura 8C). El mapeo de un único locus dentro del cromosoma 1 se confirmó por hibridación de dos sondas no repetitivas a ADN de un panel de híbridos de células somáticas representativo de cromosomas humanos individuales (datos no mostrados). Estos resultados fueron compatibles con la clonación de secuencias que abarcan la t(1;14)(q21;q32) en FR4.

El análisis de secuencia de las regiones de punto de rotura en los cromosomas derivados y el alineamiento con los loci 14q32 y 1q21 de la línea germinal revelaron que el punto de rotura se había producido en el intrón entre $CH3$ y el exón transmembrana de $C\alpha_1$ en el cromosoma 14. Aunque la región del punto de rotura estaba desprovista de secuencias señal de recombinación (RSS) o secuencias de señal de cambio (Kuppers et al., 1999), la secuencia CTTAAC (subrayada en la Figura 8B) estaba presente en ambos cromosomas 14 y 1 de la línea germinal en la unión del punto de rotura. Una copia de esta secuencia estaba presente en cada uno de los cromosomas derivados, con una ligera modificación en la copia der(1) (mutación puntual en el último nucleótido: C a G). Los nucleótidos AT que preceden a CTTAAC en el cromosoma 1 también estaban presentes en ambos cromosomas derivados (Figura 8B). La translocación no dio lugar a ninguna pérdida de secuencias en el cromosoma 1. Por otro lado, en la porción del cromosoma 14 de der(1) los autores de la presente invención observaron dos deleciones aguas arriba de la unión del punto de rotura: una deleción de 16 nucleótidos (GGCACCTCCCCTTAAC) y una deleción de 4 nucleótidos (TGCA) 6 nucleótidos aguas arriba (Figura 8B). Estas observaciones indican que la t(1;14)(q21;q32) en las células FR4 representa una translocación recíproca equilibrada posiblemente facilitada por la presencia de secuencias homólogas. (CTTAAC) en ambos cromosomas.

La región del punto de rotura de 1q21 contiene genes que codifican nuevos miembros de la superfamilia de receptores de inmunoglobulina

Los autores de la presente invención investigaron a continuación si la región del cromosoma 1q21 que abarca el punto de rotura de la translocación en FR4 contiene una unidad transcripcional. El ADN de los clones de PAC parcialmente solapantes 49A16 y 210K22 (Figura 13) fueron clonados por medio de "pistola génica" en plásmidos, secuenciados y analizados para determinar la homología con genes conocidos en bases de datos del genoma humano. Paralelamente, se buscaron los genes candidato en el PAC 49A16 por medio de una estrategia de captura de exones (Church et al., 1994).

El mapeo de los exones candidato sobre los clones genómicos de 1q21 reveló que el punto de rotura de FR4 se había producido entre dos exones atrapados (véase más abajo, Figura 13), que pertenecían al mismo transcrito, ya que podrían estar conectados por RT-PCR utilizando ARN de bazo. A continuación, se utilizó este producto de RT-PCR como sonda para escrutar una biblioteca de ADNc de bazo con el fin de aislar clones completos correspondientes a este transcrito. Se identificaron dos conjuntos de clones de ADNc, que pertenecían a dos transcritos distintos y que compartían una identidad de secuencia de ARNm de 76% dentro de la región de la sonda de 443 pb. Los clones de ADNc completos para ambos transcritos se obtuvieron mediante amplificación rápida de

extremos de ADNc (RACE) en ADNc de bazo humano que generó productos de extensión 5' y 3'.

La estructura esquemática del ADNc que representa el primer transcrito se representa en la Figura 9A. El uso alternativo de los tres posibles sitios de poliadenilación en su región no traducida 3' da lugar a tres especies de ARNm de 2,6, 2,7 y 3,5 kb, que codifican la misma supuesta proteína de 515-aminoácidos (Figura 9A). Las características pronosticadas de esta proteína incluyen un péptido señal, de acuerdo con la regla [-3, -1] (von Heijne, 1986), cuatro dominios extracelulares de tipo Ig que llevan tres sitios de glicosilación potenciales unidos a (N) de asparragina (Figura 9A), uno transmembrana de 16 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 106 aminoácidos, con tres supuestos dominios de unión de homología 2 a Src (SH2) consenso (Unkeless y Jin, 1997) (Figura 10B). Estos dominios de unión a (SH2) muestran características de motivos tanto ITAM (Motivo Inmunorreceptor basado en la Activación de Tirosina D/EX₇D/EX₂YXXL/IX₆₋₈YXXL/I; donde X indica los residuos no conservados) (Reth, 1989) como motivos ITIM (Motivo de Inhibición de Inmunorreceptor basado en Tirosina - S/V/L/IYXXL/V, donde X indica residuos no conservados) (Unkeless y Jin, 1997). Como se muestra en la Figura 10B, los primeros dos dominios de unión a SH2 están espaciados por 8 aminoácidos, en consonancia con el motivo ITAM consenso. A diferencia del consenso, el residuo glutamato (E) se posiciona cuatro en lugar de dos aminoácidos antes de la primera tirosina (Y) (Figura 10B), y la posición +3 con respecto a la tirosina (Y) está ocupada por valina (V) en lugar de leucina (L) o isoleucina (I) (Cambier, 1995). Los tres dominios se ajustan al consenso ITIM y cada uno está codificado por un exón separado, como es el caso de ITIM. Así, su disposición puede dar lugar a tres ITIM o posiblemente a un ITAM y un ITIM. La estructura general de esta proteína sugiere que representa un nuevo receptor transmembrana de la superfamilia de Ig y por lo tanto se denominó IRTA1 (gen 1 Asociado a la Translocación del Receptor Inmunitario 1).

El segundo ADNc comparte homología con *IRTA1* (68% de identidad de nucleótidos para la longitud del mensaje de IRTA1 que codifica su dominio extracelular) y fue denominado *IRTA2*. El locus *IRTA2* es más complejo que *IRTA1* y se transcribe en tres isoformas de ARNm principales (*IRTA2a*, *IRTA2b*, *IRTA2c*) de diferente peso molecular (2,8, 4,7 y 5,4 kb respectivamente), cada uno con una propia única región no traducida 3' (Figura 9B). Adicionalmente, un transcrito de 0,6 kb (Figura 12A) surge del uso de una señal de poliadenilación temprana en el nucleótido 536 de *IRTA2*. Las tres isoformas de la proteína *IRTA2* pronosticadas codificadas por estos transcritos comparten una secuencia de aminoácidos común hasta el residuo 560, que presenta un péptido señal común y seis dominios de tipo Ig extracelulares (Figura 9B). *IRTA2a* codifica una glicoproteína secretada de 759 aa con ocho dominios de tipo Ig seguido de 13 aminoácidos predominantemente polares únicos en su extremo C. *IRTA2b* diverge de *IRTA2a* en el residuo de aminoácido 560, y se extiende a lo largo de un corto tramo de 32 residuos adicionales, cuyo carácter hidrófobo es compatible con su acoplamiento a la membrana plasmática a través de un ancla de GPI (Ferguson y Williams, 1988). *IRTA2c* es la isoforma más larga cuya secuencia se desvía de *IRTA2a* en el aminoácido 746. Codifica una glicoproteína transmembrana de tipo I de 977 aa con nueve dominios de tipo Ig extracelulares, que alberga ocho sitios de glicosilación unidos a N potenciales, uno transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio citoplásmico de 104 aminoácidos con tres motivos de unión a SH2 consenso (Figura 10B). Cada uno de los sitios de unión a SH2 en *IRTA2c* coincide con el consenso ITIM (Figura 10B) y es codificado por un exón separado. Estos rasgos sugieren que *IRTA2c* es un receptor transmembrana novedoso de la superfamilia de Ig con isoformas secretadas y unidas a GPI.

Homología entre las proteínas IRTA y los receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas

El alineamiento de aminoácidos de la totalidad de los dominios extracelulares de las proteínas *IRTA1* e *IRTA2* entre sí y con otros miembros de la superfamilia de Ig reveló una homología notable entre ellos (identidad de 47% y similitud de 51%) y una homología inferior, pero llamativa con la familia de proteínas receptoras de Fc gamma. Esta homología era más fuerte en las posiciones de aminoácidos conservados entre las diferentes clases de receptores de Fc. Entre los receptores de Fc, el receptor de IgG de la alta afinidad FCGRI (CD64) compartió los más altos niveles de homología con los tres primeros dominios Ig de *IRTA1* e *IRTA2* (identidad de 37% y similitud de 50%) a lo largo de toda su porción extracelular (Figura 10A). Se observaron niveles inferiores de homología entre las proteínas *IRTA* y los dominios extracelulares de otras moléculas de la superficie celular, incluyendo la molécula de adherencia endotelial de plaquetas humanas (PECAM1), la molécula de adherencia celular de linfocitos B (CD22) y la glicoproteína biliar 1 (BGP1) (22-25% de identidad, 38-41% de homología).

No existe homología aparente entre las *IRTA* y los miembros de la familia de receptores de Fc en sus dominios citoplásmicos. En contraste, existe una homología de aminoácidos significativa entre *IRTA1* y PECAM1 (identidad de aminoácidos de 31% y homología de 45%), *IRTA2c* y BGP1 (identidad de 30%, homología de 35%) e *IRTA2c* y PECAM1 (28% de identidad, 50% de homología) (Figura 10B). Estas homologías sugieren el empleo de rutas de señalización aguas abajo similares por parte de estas proteínas diferentes.

IRTA1 e *IRTA2* normalmente se expresan en subpoblaciones específicas de células B

El patrón de expresión normal de los ARNm de *IRTA1* e *IRTA2* se analizó primero por hibridación de transferencia de Northern del ARN derivado de diferentes tejidos humanos normales y de las líneas celulares humanas que representan diferentes linajes hematopoyéticos y etapas de desarrollo de células B.

Se detectó la expresión de *IRTA1* a un nivel muy bajo en ARN de bazo y ganglios linfáticos humanos (Figura 11A, panel izquierdo) y fue indetectable en todos los otros tejidos humanos analizados, incluyendo el hígado fetal, médula

ósea, pulmón, placenta, intestino delgado, riñón, hígado, colon, músculo esquelético, corazón y cerebro (datos no mostrados). Entre las líneas de células B, la expresión de *IRTA1* estaba ausente en líneas de células que representan células pre-B y células B del centro germinal, células plasmáticas y células de origen eritroide, células T y mieloides (datos no mostrados, véase Materiales y Métodos). La expresión fue detectable a niveles muy bajos solamente en líneas celulares linfoblastoides (LCL) immortalizadas con EBV, que representan una subpoblación (inmunoblastos) situada aguas abajo de las células B del centro germinal en la diferenciación de células B. Sin embargo, la expresión se indujo en células ER/EB privadas de estrógeno que, al estar immortalizadas por un genoma de EBV recombinante en el que el gen EBNA2 se fusiona con el receptor de estrógeno, proliferan en presencia de estrógeno, mientras se detienen en la fase G₀/G₁ tras la privación de estrógeno (Kempkes et al., 1995). La expresión de *IRTA1* era apenas detectable en estas células en presencia de estrógeno, pero fue inducida (10 veces) después de la detención G₀/G₁ tras la retirada de estrógenos (Figura 11A, panel derecho). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que *IRTA1* se expresa en una subpoblación linfóide presente en el bazo y los ganglios linfáticos y, presumiblemente, representada por células B en reposo.

Para investigar más el fenotipo y la distribución en los tejidos de las células que expresan *IRTA1*, los autores de la presente invención realizaron la hibridación *in situ* en tejido tonsilar humano utilizando una sonda de ADNc antisentido de *IRTA1* (Figura 11B). Se procesaron las secciones seriadas para la hibridación *in situ* con una sonda de ADNc efectora de control (Panel Núm. 1 en la figura 11B), una sonda de ADNc antisentido (Panel Núm. 2) y tinción con hematoxilina y eosina (H & E) (Panel Núm. 3) para esbozar la arquitectura del tejido linfóide. La señal de hibridación de *IRTA1* fue excluida del centro germinal y la zona de manto de los folículos y se concentró característicamente en la zona perifolicular con infiltraciones en la región intraepitelial (Figuras 11B-2, 11B-4). En esta región, sólo las células B fueron positivas tal como se documenta mediante la tinción con marcadores específicos de células B (IGD, no mostrado), y mediante análisis inmunohistoquímico con anticuerpos anti-*IRTA1* y anti-B (CD20, PAX5), anti-T (CD3), y anti-monocitos (CD68) (no mostrados; G. Cattoretti et al., manuscrito en preparación.). Esta área perifolicular es la "zona marginal" equivalente a la amígdala, lo que representa un compartimiento de células B funcionalmente distinta que contiene la mayoría de las células B de memoria y las células B monocitoides (de Wolf-Peters et al., 1997). Junto con el análisis de transferencia Northern de tejidos normales y líneas celulares, estos resultados indican que *IRTA1* se expresa en una subpoblación de células B maduras en reposo topográficamente ubicada en la región perifolicular e intraepitelial, sitios ricos en células B de memoria.

En el caso de *IRTA2*, el análisis de transferencia Northern detectó todas las especies empalmadas alternativamente en ARNm de ganglio linfático, bazo, médula ósea e intestino delgado humanos, con una preponderancia relativa de la isoforma *IRTA2a* (Figura 12A, panel izquierdo). Entre las líneas de células hematopoyéticas de origen linfóide y no linfóide sometidas a ensayo, la expresión de *IRTA2* se restringió a las líneas de células B con un fenotipo post-centro germinal inmunoblástico (Figura 12A, panel derecho). De manera similar a *IRTA1*, estaba ausente de las líneas celulares derivadas de células pre-B, centoblastos del centro germinal, células plasmáticas, células T, células eritroides y células mieloides (Figura 12A, panel derecho).

El análisis de hibridación *in situ* de tejido tonsilar humano, utilizando el ADNc de *IRTA2* como sonda, fue compatible con los resultados del análisis de transferencia Northern. El ARNm de *IRTA2* fue excluido en gran parte de la zona del manto del centro germinal, con la excepción de unas pocas células positivas (Figuras 12B-2, 12B4). Dentro del centro germinal, la zona oscura, representada por centoblastos, apareció negativa para *IRTA2*, mientras que la zona clara, rica en centrocitos, fue fuertemente positiva (Figuras 12B-2, 12B-4). Finalmente, el ARNm de *IRTA2* se detectó en la región equivalente de la "zona marginal" fuera de los folículos de los centros germinales y en las regiones intraepiteliales e interfoliculares de la amígdala. Este patrón es compatible con la especificidad de *IRTA2* para los centrocitos y las células post-B del centro germinal. Comparando sus patrones de expresión, los autores de la presente invención concluyen que ambos son específicos para las células B maduras, pero *IRTA2* tiene un patrón más amplio de expresión que incluye centrocitos y células B interfoliculares, mientras *IRTA1* está restringida a las células B de la zona marginal, muy probablemente células de memoria.

Organización genómica de los genes *IRTA1* e *IRTA2*

Para entender las consecuencias de las anomalías 1q21 sobre la estructura y la expresión de los genes *IRTA1* e *IRTA2*, los autores de la presente invención determinaron primero la organización de sus loci genómicos. El gen *IRTA1* contiene 11 exones con un tamaño genómico total de 24,5 kb (Figura 13). Se encontró que el locus *IRTA2* abarcaba una región genómica de aproximadamente 40 kb (Figura 13). Los tres productos empalmados alternativamente de *IRTA2* comparten sus primeros 8 exones, en cuyo punto *IRTA2b* no utiliza el siguiente sitio de empalme, y termina introduciendo su región UTR 3'. Las isoformas *IRTA2a* y 2c se empalman en el exón 9, entrando *IRTA2a* en su UTR 3' después del exón 11 y empalmando *IRTA2c* en el exón 12 y extendiéndose hasta el exón 18 (Figura 13).

Basándose en los datos de secuenciación, los autores de la presente invención determinaron que los genes *IRTA1* e *IRTA2* se encuentran a 21 kb el uno del otro, yuxtapuestos en la misma orientación transcripcional (Figura 13) que se extiende desde el telómero (5') hacia el centrómero (3'). En el locus 1q21, están estrechamente conectados el uno al otro, así como a tres genes adicionales que habían clonado recientemente los autores de la presente invención a través de su homología con las IRTA (I.M., manuscrito en preparación). Los cinco genes son contiguos,

cubriendo una región de ~ 300 kb en 1q21. Esta región se encuentra en el intervalo entre los puntos de rotura de 1q21 referidos anteriormente. Basándose en la distancia entre clones genómicos que albergan los genes respectivos en el mapa Whitehead Institute Radiation Hybrid, se estima que el locus de *IRTA1-2* se encuentra aproximadamente a 0,8 Mb de distancia del locus *MUC1* hacia el telómero (N.P., datos no publicados; Dyomin et al., 2000; Gilles et al., 2000) y a menos de o igual a 7 Mb del locus *FCGR1B* hacia el centrómero (N.P., datos no publicados).

La translocación t(1;14)(q21;q32) genera una proteína de fusión *IRTA1/Ca₁* en la línea celular de mieloma FR4. El análisis comparativo de restricción y de la secuencia de nucleótidos de la línea germinal frente a las secuencias reordenadas de los loci *Ca₁* e *IRTA1* mostró que la translocación había fusionado las secuencias en el intrón 2 del gen *IRTA1* a las secuencias intrónicas entre *CH3* y el exón transmembrana de *Ca₁* en la misma orientación transcripcional (Figura 14A). Esto sugiere que, si las secuencias de *IRTA1* se expresaban en el locus translocado, el sitio donante intacto en el límite 3' del exón *IRTA1* y el sitio aceptor intacto en el 5' de *Ca₁* podrían ser utilizados para generar un ARNm de fusión *IRTA1/Ca₁*, y posiblemente una proteína de fusión *IRTA1/Ca₁*.

Con el fin de someter a ensayo esta predicción, los autores de la presente invención analizaron la expresión del ARNm de *IRTA1* en FR4 por medio de análisis de transferencia Northern utilizando una sonda de ADNc de *IRTA1* derivada del exón 1 (Figura 14A). Esta sonda detectaba un mensaje de 0,8 kb en FR4 que estaba ausente de otras líneas de células B, y era más corto que el mensaje normal de 2,5 kb detectable en células ER/EB (Figura 14B). Los autores de la presente invención clonaron este transcrito por medio de RT-PCR del ARNm de FR4 utilizando cebadores derivados de secuencias en el límite 5' del exón 1 de *IRTA1* y el límite 3' del exón citoplásmico *Cα* (Figura 14A). Se obtuvo un producto de RT-PCR de FR4, pero no de la línea celular DAKIKI que expresa la IgA de la superficie de tipo salvaje, u otras líneas celulares que carecen de una translocación t(1;14) (datos no mostrados). El análisis de secuenciación directa del producto de PCR indicó que el empalme había ligado de manera precisa *IRTA1* y *Ca₁* en los sitios de empalme canónicos y determinó que el transcrito de fusión tenía 820 pb de longitud.

El análisis del producto de proteína pronosticado indicó que el empalme *IRTA1/Ca₁* había dado lugar a una fusión entre el péptido señal *IRTA1* y los dos primeros aminoácidos extracelulares, con el espaciador largo extracelular de 32 aminoácidos, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática del receptor de IgA₁ de membrana (mIgA₁) (Figura 14C). Para el análisis de la expresión de esta proteína de fusión en extractos de proteína FR4, los autores de la presente invención utilizaron un anticuerpo dirigido contra residuos de aminoácidos extracelulares específicos para la isoforma transmembrana de *Cα₁* (Yu et al., 1990) para la inmunoprecipitación, seguido de transferencia Western. Los resultados de los autores de la presente invención demuestran que las células FR4, pero no una línea celular de control (DAKIKI) que expresa IgA de la superficie de tipo salvaje, expresan una proteína de 9,8 kDa acorde con el tamaño pronosticado de la proteína de fusión *IRTA1/Cα₁* (Figura 14D). Estos resultados muestran que el alelo translocado codifica una proteína de fusión, compuesta por el péptido señal y los dos primeros residuos extracelulares de *IRTA1* (17 aminoácidos) fusionado a los dominios transmembrana y citoplásmicos codificados por *Cα₁* (71 aminoácidos). En contraste con la expresión en exceso de *IRTA1/Cα₁* en der(14), no se detectó expresión en FR4 para el transcrito recíproco *Ca₁/IRTA1* o para el gen *IRTA2* intacto en der(1).

Con la excepción de FR4, no se detectó expresión de ARNm de *IRTA1* en ninguna otra línea celular de mieloma o linfoma, independientemente del estatus de su banda cromosómica 1q21 (datos no mostrados). Por lo tanto, la fusión *IRTA1/Ca* representa un evento raro en las aberraciones de 1q21.

Desregulación frecuente de la expresión de *IRTA2* en líneas celulares que portan anomalías de 1q21

Con el fin de establecer la relación física entre otros puntos de rotura de 1q21 y el locus de *IRTA1/2*, los autores de la presente invención realizaron un análisis FISH con el PAC 49A16 en el panel de líneas celulares BL y MM de los autores de la presente invención. De diez líneas celulares BL analizadas, siete con dup(1) (q21q32) y tres con translocaciones 1q21 (AS283A, BL104, BL136), los autores de la presente invención detectaron tres señales correspondientes al locus de *IRTA1/IRTA2* en siete de las primeras y dos de las últimas, en consonancia con dup(1) (q21q32) en el primer caso y dup(1) (q21q32) seguido de un punto de rotura de translocación en 1q21 en el segundo (Tabla 1). El análisis FISH de AS283A y BL136, utilizando sondas que abarcan el locus de *IRTA* y con clones genómicos vecinos, situó el punto de rotura de los cromosomas derivados fuera del locus de *IRTA* en ambas líneas celulares, a una distancia de >800 kb hacia el centrómero en AS283A y >800 kb hacia el telómero en BL136 (N.P., resultados no publicados). En consonancia con este hallazgo, el análisis de 30 casos de tumores primarios MM por medio de FISH de interfase con el YAC de 300 kb 23GC4 (Figura 13), mostró que 15 casos (50% del total analizado) tenían más de dos señales de FISH en interfase (datos no mostrados), mientras que el FISH de dos colores con dos clones de PAC que flanqueaban las fronteras centroméricas y teloméricas de YAC no detectó ninguna escisión de estas dos sondas en ninguno de los casos. Estos resultados indican que, con la excepción de FR4, los puntos de rotura de las aberraciones de 1q21 en BL o MM no están dentro de o en estrecha proximidad con la región genómica definida por *IRTA1* e *IRTA2*. Sin embargo, el resultado coherente de cualquiera dup(1) (q21q32) (véase la Tabla 1) o dup(1) (q21q32) seguido de translocaciones desequilibradas (AS283A, BL136, XG2, XG7 en la Tabla 1) es la trisomía o tetrasomía parcial de la región de 1q21 que contiene los genes de *IRTA*.

Tabla 1. Resumen de los datos del cariotipo y FISH en el locus *IRTA1/IRTA2*

Tipo de tumor	Citogenética	PAC 49A16	Número de copias del locus IRTA por FISH	Expresión de ARNm de <i>IRTA2</i>
Linfoma de Burkitt				
AS283A	der(4) t(1;4) (q21; q35)	der(4), normal 1	3	+++++
MC116	duplq21	dup1q21	3	+++
CA46	duplq21	duplq21	3	+++
PA682	duplq21	duplq21	3	++
BrglgA	duplq21	dup1q21	3	++
BL32	dup1q21	dup1q21	3	-
BL92	dup1q21	dup1q21	3	++
BL103	invdup1q21	dup1q21	3	+
BL104	t(1; 3) (q21;p25)	der(1)	2	+
BL136	der(1) (qpter1q21 :: q21)	der(1)	3	++
Mieloma múltiple				
XG2	der(1) t(1;?) (q21 ;?)	der(1), normal 1	3	++++
	der 19 t(1;19) (q12;?)	der(19)		
XG7	der(9) t(1; 9) (q12 ;?)	der(9)	4	-
	der(19) t(1;19) (q12;?)	der(19)		
	der(1) t(1 ;?) (q21 ;?) x2	der(1) x2		

A continuación, los autores de la presente invención investigaron si estas aberraciones tenían un efecto sobre la expresión del ARNm de *IRTA2*. Con este fin, los autores de la presente invención utilizaron una sonda de ADNc correspondiente a la región no traducida 5' de *IRTA2* para escrutar una transferencia Northern con un panel de líneas celulares de B-NHL y MM carentes de o que mostraban anomalías cromosómicas en 1q21. Los resultados muestran que la mayoría (diez de doce) líneas BL con cromosomas 1q21 normales carecen esencialmente de expresión de *IRTA2*, coincidiendo con el hecho de que los BL derivan de centroblastos GC que normalmente carecen de expresión de *IRTA2* (Figura 15A, panel izquierdo). Por el contrario, la mayoría de las líneas BL que portan anomalías en 1q21 (diez de doce) muestran claramente una regulación al alza del ARNm de *IRTA2* (Figura 15A, panel derecho), que oscilan de 2 a 50 veces sobre los niveles basales detectados en BL con 1q21 normal. Entre las líneas celulares de mieloma, *IRTA2* era expresada en exceso en una de cada tres líneas que muestran anomalías en 1q21 (XG2), mientras que no se expresaba en ninguna de las siete con 1q21 normal (Figura 15B).

Estos resultados muestran una fuerte correlación entre la presencia de aberraciones cromosómicas 1q21 y la desregulación de la expresión de ARNm de *IRTA2* en BL y sugieren que las trisomías del locus *IRTA2* pueden desregular su expresión en este subtipo de linfoma (véase la Discusión).

Discusión

Los esfuerzos descritos en la presente memoria para identificar genes implicados en las aberraciones cromosómicas que afectan a la banda 1q21 en el Mieloma Múltiple y el linfoma de células B, condujeron al descubrimiento de que *IRTA1* e *IRTA2*, dos miembros fundadores de una nueva subfamilia de receptores relacionados dentro de la familia de inmunorreceptores; las secuencias de ácido nucleico completas que codifican las proteínas *IRTA1* e *IRTA2* son proporcionadas en la presente memoria, así como las secuencias de aminoácidos de las proteínas *IRTA1* e *IRTA2* codificadas. Con posterioridad tres genes adicionales de los miembros de esta subfamilia de receptores relacionados fueron aislados, *IRTA3*, *IRTA4*, e *IRTA5*, cuyas secuencias de ácido nucleico completas se proporcionan en la presente memoria, así como las secuencias de aminoácidos de las proteínas *IRTA3*, *IRTA4*, e *IRTA5* codificadas. Estos resultados tienen implicaciones para la biología normal de las células B, así como para el papel de las aberraciones de 1q21 en la linfomagénesis.

IRTA1 e IRTA2 son miembros fundadores de una nueva subfamilia dentro de la superfamilia de Ig

Varias características compartidas entre los dos genes de IRTA y sus proteínas codificadas sugieren que forman una nueva subfamilia dentro de la superfamilia de inmunorreceptores. En primer lugar, comparten un mayor grado de homología entre sí en sus dominios extracelulares que con otros miembros de la superfamilia tanto en su secuencia de ARNm (identidad de 68%) como de proteína (identidad de 47%). En segundo lugar, comparten homología en sus dominios citoplásmicos, marcados por la presencia de motivos de señalización de tipo ITAM e ITIM en el contexto de las secuencias de aminoácidos homólogas. En tercer lugar, IRTA1 e IRTA2 pertenecen a una subfamilia más grande de cinco genes que muestra mayor homología intrafamiliar y una estrecha agrupación dentro de una región de ~ 300 kb en 1q21 (I.M. et al., Manuscrito en preparación). Su organización genómica sugiere que un gen ancestral común puede haber dado lugar a esta subfamilia, por medio de un proceso de duplicación y divergencia de secuencia, similar al mecanismo propuesto para la familia de receptores de Fc (Qiu et al., 1990).

En su dominio extracelular, las proteínas IRTA están estrechamente relacionadas con la subfamilia de receptores de Fc basándose en el alto grado de homología de aminoácidos compartida especialmente con el receptor FCGR1 de alta afinidad (37-45% de identidad de aminoácidos). También sugiere un origen evolutivo común con los receptores de Fc por la posición del locus de la familia *IRTA* en el intervalo entre el locus *FCGR1* en 1q21 y los loci *FCER1* y *FCGR2-III* en 1q21-q23. Por último, los genes *IRTA* y *FCR* comparten una organización exón/intrón similar de la porción del gen que codifica su péptido señal, en particular, los dos exones líder 5' con las secuencias que codifican el sitio de la peptidasa señal ubicado dentro del segundo exón de 21 pb.

Basándose en sus motivos de tipo ITIM citoplasmáticos, las proteínas IRTA se pueden considerar miembros de la Superfamilia de Receptores Inhibidores (IRS), un grupo de receptores que bloquean la activación de muchos tipos de células en el sistema inmunitario (Lanier, 1998). Tales miembros incluyen FCGR2B y CD22 en el ser humano (DeLisser et al., 1994) y PIR-B en el ratón (Kubagawa et al., 1997). De un modo análogo a los miembros de IRS, los ITIM de IRTA1 e IRTA2 están codificados por exones individuales. Una característica que comparten muchos miembros de IRS es la existencia de las correspondientes isoformas activadoras del receptor cuyos dominios citoplásmicos están desprovistos de ITIM (revisado en Ravetch y Lanier, 1998). Es posible que la isoforma secretada de IRTA2, que carece de motivos de tipo ITIM, cumpla un papel análogo al contrarrestar el efecto de la isoforma transmembrana.

Las proteínas IRTA1 e IRTA2 y los miembros de la subfamilia las Moléculas de Adherencia Celular (CAM) PECAM1, CD22 y BGP1 comparten una homología significativa en la secuencia y la organización general de su porción extracelular. Además, la capacidad de IRTA2 para generar tres isoformas de la proteína con una localización subcelular distinta (una proteína transmembrana, una unida a GPI o una secretada) por corte y empalme diferencial es compartida por NCAM, otro miembro de la subfamilia de CAM (Dickson et al., 1987; Gower et al., 1988). Por lo tanto, la familia de IRTA también se relaciona con la familia de CAM, como se ha sugerido previamente para un miembro de la familia de receptores de Fc (FCGR2 murino) debido a su homología con PECAM1 (CAM, familia IRS) (Daeron, 1991; Newman et al., 1990; Stockinger et al., 1990).

En conclusión, la familia de IRTA puede representar una intersección entre las familias de Fc, IRS y CAM, que combina las características de las tres. En consecuencia, las proteínas IRTA pueden tener un papel en la regulación de la transducción de señales durante una respuesta inmunitaria (como receptores de Fc), en la comunicación intercelular (como miembros de las familias IRS y CAM) y en la migración celular (como miembros de la familia CAM) (DeLisser et al., 1994; Ravetch y Lanier, 2000). Los experimentos iniciales indican que IRTA1 se puede unir débilmente a la IgA agregada por calor, mientras IRTA2c se puede unir específicamente a la IgG de suero humano agregada por calor (con mayor afinidad para IgG₁ e IgG₂), pero no a IgG, IgA, IgM e IgE humanas monoméricas (datos no mostrado). Estos datos iniciales apoyan una relación funcional entre IRTA y las familias de receptores de Fc, pero no excluyen las funciones que dependen de otros ligandos para las proteínas IRTA.

Patrón de expresión diferencial de los genes de IRTA en células B maduras

Los genes *IRTA* muestran un patrón de expresión específico en diversos compartimentos de células B normales. *IRTA1* está topográficamente restringida a las células B dentro de la región perifolicular, que se denominó originalmente zona marginal en el bazo, pero también es detectable en la mayor parte de los órganos linfoides (de Wolf-Peeters et al., 1997). Los datos de hibridación *in situ* que aquí se presentan han sido confirmados por análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpos anti-IRTA1 que muestran que la proteína IRTA1 se expresa selectivamente en células B de la zona marginal, y, entre los NHL, en el linfoma de la zona marginal, los tumores derivados de estas células (G. Cattoretti et al., manuscrito en preparación). Por otra parte, *IRTA2* tiene un patrón de expresión más amplio que incluye centrocitos GC, así como un amplio espectro de células perifoliculares, que pueden incluir inmunoblastos y células de memoria. Los datos iniciales sugieren que el patrón de expresión de *IRTA3* es análogo al de *IRTA2*, mientras que *IRTA4* e *IRTA5* se expresan selectivamente en las células B de la zona del manto (I. Miller et al., manuscrito en preparación), el compartimiento pre-GC de las células B maduras (MacLennan, I.C., 1994). Esta restricción topográfica de la expresión génica de *IRTA* en los órganos linfoides sugiere que las moléculas de IRTA pueden desempeñar un papel en la migración o actividad de diversas subpoblaciones de células B en compartimentos específicos de células B funcionales. Además, la expresión de IRTA debería ser útil para el diagnóstico diferencial de los subtipos de NHL que derivan de diversos compartimentos de células B, en particular IRTA1 en el diagnóstico del linfoma de la zona marginal.

Locus de *IRTA1* y anomalías de 1q21 en MM

En la línea celular FR4, la consecuencia de la translocación t(1;14) es la formación de un gen de fusión *IRTA1/Cα₁*. A pesar del hecho de que este gen está dirigido por la región promotora de *IRTA1*, que normalmente es silencioso en las células plasmáticas, su expresión es alta en FR4, presumiblemente debido a la influencia de LCR 3' de *Cα₁*, que es retenido aguas abajo del locus *Cα₁*. El gen de fusión codifica una proteína de fusión *IRTA1/Cα₁* que contiene sólo el péptido señal y los primeros dos aminoácidos de *IRTA1* unidos al receptor de IgA de la superficie. Este último ha sido desprovisto casi completamente de su dominio extracelular, pero conserva todos sus dominios transmembrana e intracelulares. Esta estructura indica que la proteína de fusión *IRTA1/Cα₁*, aunque probablemente incapaz de unirse a cualquier ligando, puede conservar el potencial para la dimerización y la señalización. En particular, la porción extracelular derivada de IgA de membrana (m) contiene un residuo de cisteína, que puede estar implicado en enlaces disulfuro entre dos cadenas α o entre cadenas α y proteínas asociadas, tales como el receptor de la superficie coadyuvante CD19 (Leduc et al., 1997). La proteína de fusión también porta el dominio citoplásmico mIgA de 14 aminoácidos intacto, que está altamente conservado en evolución (Reth, 1992) y puede desempeñar un papel esencial en la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de células B maduras, de forma análoga al papel de mIgG y mIgE (Kaisho et al., 1997). Por lo tanto, la aparición de la proteína *IRTA1/Cα₁* en FR4 puede haber proporcionado a las células una ventaja proliferativa y de supervivencia durante el desarrollo del tumor a través la activación independiente del ligando (antígeno) de la ruta de BCR. Este evento de fusión sin embargo, parece ser poco frecuente en las neoplasias malignas de células B, ya que hasta ahora los autores de la presente invención han sido capaces de detectarlo sólo en las células FR4.

Locus de *IRTA2* y anomalías de 1q21 en MM y BL

La expresión anormal de *IRTA2* es una consecuencia frecuente de las anomalías en 1q21. Aunque este gen no se expresa normalmente en centroblastos, las presuntas contrapartes normales de BL (Kuppers et al., 1999), ni en BL con 1q21 normal, sus niveles están regulados al alza un promedio de 10 veces en líneas celulares de BL con anomalías en 1q21. Esta desregulación parece ser específica para *IRTA2* ya que todos los otros 4 genes de *IRTA* presentes dentro de 300 kb en 1q21, o bien no se expresan en BL (*IRTA1*), o bien su patrón de expresión no se corresponde con la presencia de anomalías en 1q21 (*IRTA3*, 4, 5, no mostrado). El mecanismo por el cual se produce esta desregulación es difícil de determinar en ausencia de lesiones estructurales dentro o adyacentes al gen de *IRTA2*. Dado que las aberraciones heterogéneas que afectan a 1q21 ocasionan todas un número de copias en exceso del locus de *IRTA*, es posible que esto pueda conducir a trastornos de la regulación, como en el caso de un bajo nivel de amplificación de *BCL2* en FL que carece de translocaciones (14;18) (Monni et al., 1997), *REL* en linfoma difuso de células grandes (Houldsworth et al., 1996; Rao et al., 1998) y desregulación de Ciclina D1 en algunos casos de MM con trisomía 11 (Pruneri et al., 2000). Por otra parte, las anomalías en 1q21, incluyendo translocaciones y duplicaciones, cambian el contexto genómico del locus de *IRTA* y pueden conducir a la desregulación de *IRTA2* por elementos de organización de la cromatina potenciadores que actúan en cis distantes que actúan sobre su promotor como es el caso *MYC* en BL endémico (Pelicci et al., 1986) y MM (Shou et al., 2000) y para *CCND1* en el linfoma de células del manto (Bosch et al., 1994; Swerdlow et al., 1995) y MM (Pruneri et al., 2000).

Las consecuencias biológicas de una expresión desregulada de *IRTA2* son difíciles de predecir en esta etapa. La observación de que *IRTA2* tiene homología con los receptores de adherencia CAM, junto con su distribución específica en la zona clara del GC sugieren que su expresión ectópica en centroblastos puede causar una interrupción en el desarrollo y la arquitectura del GC. Por otro lado, las observaciones iniciales de los autores de la presente invención de que *IRTA2* se puede unir a complejos inmunitarios con IgG de una manera comparable a los receptores de Fc bona fide sugieren que su expresión inapropiada puede perturbar la dinámica de la regulación de la superficie celular de las respuestas inmunológicas de células B, conduciendo posiblemente a la expansión clonal. Se ha propuesto que la expresión desregulada de *FCGR2B* como consecuencia de la t(1;14)(q21;q32) en el linfoma folicular contribuye a la linfomagénesis en este tipo de tumor (Callanan et al., 2000), por medio de un mecanismo que implica la huida por parte de las células tumorales de la vigilancia inmunitaria anti-tumoral a través de su unión a Fc y de la inactivación de la IgG específica del tumor. Se han observado mecanismos de evasión similares en las células infectadas por herpesvirus que codifican Fc (Dubin et al., 1991). Es necesario probar el papel de la desregulación de *IRTA2* en la "ganancia de función" de ratones transgénicos que expresan constitutivamente *IRTA2* en el GC.

Referencias para la segunda serie de experimentos

Anand, R., Riley, J. H., Butler, R., Smith, J. C., y Markham, A. F. (1990). A 3.5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterisation, screening and storage. *Nucleic Acids Res* 18, 1951-6.

Avet-Loiseau, H., Andree-Ashley, L. E., Moore, D., 2º, Mellerin, M. P., Feusner, J., Bataille, R., and Pallavicini, M. G. (1997). Molecular cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and plasma cell leukemia measured using comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 19, 124-33.

Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., y Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on

chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906.

Berger, R., Bernheim, A. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: una revisión. *IARC Sci Publ* 60, 65-80.

Bergsagel, P. L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Kirby, S. L., y Kuehl, W. M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13931-6.

Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M. A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E. S., Montserrat, E., Rozman, C. et al. (1994). PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 84, 2726-32.

Callanan, M. B., Le Baccon, P., Mossuz, P., Duley, S., Bastard, C., Hamoudi, R., Dyer, M. J., Klobeck, G., Rimokh, R., Sotto, J. J., y Leroux, D. (2000). The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 309-14.

Cambier, J. C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155, 3281-5.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Brents, L. A., Smith, C. M., Gerhard, D. S., y Kuehl, W. M. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines [see comments]. *Blood* 88, 674-81.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., and Kuehl, W. M. (1998). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91, 4457-63.

Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W. M., y Bergsagel, P. L. (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16, 260-4.

Church, D. M., Stotler, C. J., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Trofatter, J. A., y Buckler, A. J. (1994). Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic ADN using exon amplification. *Nat Genet* 6, 98-105.

Cigudosa, J. C., Parsa, N. Z., Louie, D. C., Filippa, D. A., Jhanwar, S. C., Johansson, B., Mitelman, F., y Chaganti, R. S. (1999). Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B- cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 123-33.

Daeron, M. (1991). Fc receptors, or the elective affinities of adhesion molecules. *Immunol Lett* 27, 175-81.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., y Croce, C.M.: The human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 which is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79:7824-7827, 1982.

Dalla-Favera, R., Martinotti, S., Gallo, R. C., Erikson, J., y Croce, C. M. (1983). Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219, 963-7.

de Wolf-Peeters, C., Pittaluga, S., Dierlamm, J., Wlodarska, I., y Van Den Berghe, H. (1997). Marginal zone B-cell lymphomas including mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma (MALT), monocytoid B-cell lymphoma and splenic marginal zone cell lymphoma and their relation to the reactive marginal zone. *Leuk Lymphoma* 26, 467-78.

DeLisser, H. M., Newman, P. J., y Albelda, S. M. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15, 490-5.

Dickson, G., Gower, H. J., Barton, C. H., Prentice, H. M., Elsom, V. L., Moore, S. E., Cox, R. D., Quinn, C., Putt, W., y Walsh, F. S. (1987). Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell* 50, 1119-30.

Dierlamm, J., Pittaluga, S., Wlodarska, I., Stul, M., Thomas, J., Boogaerts, M., Michaux, L., Driessen, A., Mecucci, C., Cassiman, J. J., y et al. (1996). Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features [see comments]. *Blood* 87, 299-307.

Dracopoli, C. N., Haines, J. L., Korf, B. R., Morton, C. C., Seidman, C. E., Seidman, J.G., Smith, D. R. (1997).

Current Protocols in Human Genetics (New York: Wiley & Sons)

Dubin, G., Socolof, E., Frank, I., Friedman, H. M. (1991). Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Virology* 65, 7046-50.

Dyomin, V. G., Palanisamy, N., Lloyd, K. O., Dyomina, K., Jhanwar, S. C., Houldsworth, J., y Chaganti, R. S. (2000). MUC1 is activated in a B-cell lymphoma by the t(1;14)(q21;q32) translocation and is rearranged and amplified in B-cell lymphoma subsets. *Blood* 95, 2666-71.

Dyomin, V.G., Rao, P.H., Dalla-Favera, R., Chaganti, R.S.K. (1997). BCL8, a novel gene involved in translocations affecting band 15q11-13 in diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 5728-32.

Eton, O., Scheinberg, D. A., and Houghton, A. N. (1989). Establishment and characterization of two human myeloma cell lines secreting kappa light chains. *Leukemia* 3, 729-35.

Ferguson, M. A., y Williams, A. F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57, 285-320.

Frank, D., Mendelsohn, C. L., Ciccone, E., Svensson, K., Ohlsson, R., y Tycko, B. (1999). A novel pleckstrin homology-related gene family defined by Ipl/Tssc3, TDAG51, and Tih1: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. *Mamm Genome* 10, 1150-1159.

Gaidano, G., y Dalla-Favera, R. (1997). Molecular Biology of Lymphomas. In: Principles and Practice of Oncology, Fifth Ed, DeVita, VT, Hellman, S., Rosenberg SA (eds) JB Lippincott Co (publ.), 2131-2145.

Gilles, F., Goy, A., Remache, Y., Shue, P., y Zelenetz, A. D. (2000). MUC1 dysregulation as the consequence of a tt(1;14)(q21;q32) translocation in an extranodal lymphoma. *Blood* 95, 2930-2936.

Gower, H. J., Barton, C. H., Elsom, V. L., Thompson, J., Moore, S. E., Dickson, G., y Walsh, F. S. (1988). Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell* 55, 955-64.

Hamilton, M. S., Ball, J., Bromidge, E., Lowe, J., y Franklin, I. M. (1990). Characterization of new IgG lambda myeloma plasma cell line (EJM): a further tool in the investigation of the biology of multiple myeloma. *Br J Haematol* 75, 378-84.

Houldsworth, J., Mathew, S., Rao, P. H., Dyomina, K., Louie, D. C., Parsa, N., Offit, K., Chaganti, R. S. (1996). REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 87, 25-9.

Iida, S., Rao, P. H., Butler, M., Corradini, P., Boccadoro, M., Klein, B., Chaganti, R. S., y Dalla-Favera, R. (1997). Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 17, 226-30.

Jackson, N., Lowe, J., Ball, J., Bromidge, E., Ling, N. R., Larkins, S., Griffith, M. J., y Franklin, I. M. (1989). Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2. *Clin Exp Immunol* 75, 93-9.

Jernberg, H., Zech, L., y Nilsson, K. (1987). Cytogenetic studies on human myeloma cell lines. *Int J Cancer* 40, 811-7.

Juliusson, G., Oscier, D. G., Fitchett, M., Ross, F. M., Stockdill, G., Mackie, M. J., Parker, A. C., Castoldi, G. L., Gunee, A., Knuutila, S., y et al. (1990). Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323, 720-4.

Kaisho, T., Schwenk, F., y Rajewsky, K. (1997). The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* 276, 412-5.

Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Delecluss, H. J., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W., y Hammerschmidt, W. (1995). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *Embo J* 14, 88-96.

Kornblau, S. M., Goodacre, A., Cabanillas, F. (1991). Chromosomal abnormalities in adult non-endemic Burkitt's lymphoma and leukemia: 22 new reports and a review of 148 cases from the literature. *Hematol Oncol* 9, 63-78.

Kubagawa, H., Burrows, P. D., y Cooper, M. D. (1997). A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5261-6.

Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L., y Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-9.

Lanier, L. L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359-93.

Leduc, I., Drouet, M., Bodinier, M. C., Helal, A., y Cogne, M. (1997). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* 90, 330-6.

MacLennan, I. C. (1994). Germinal Centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-39.

Magrath, I. T., Pizzo, P. A., Whang-Peng, J., Douglass, E. C., Alabaster, O., Gerber, P., Freeman, C. B., y Novikovs, L. (1980). Characterization of lymphoma-derived cell lines: comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen. I. Physical, cytogenetic, and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst* 64, 465-76.

Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., y Knuutila, S. (1997). BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90, 1168-74.

Neri, A., Barriga, F., Knowles, D. M., Magrath, I. T., y Dalla-Favera, R. (1988). Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2748-52.

Neri, A., Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., Chaganti, R. S., y Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* 67, 1075-87.

Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C. d., Lyman, S., Paddock, C., y Muller, W. A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247, 1219-22.

Offit, K., Louie, D. C., Parsa, N. Z., Roy, P., Leung, D., Lo Coco, F., Zelenetz, A., Dalla-Favera, R., Chaganti, R. S. (1995). BCL6 gene rearrangement and other cytogenetic abnormalities in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 20, 85-9.

Pellicci, P. G., Knowles, D. M. d., Magrath, I., y Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2984-8.

Polito, P., Cilia, A. M., Gloghini, A., Cozzi, M., Perin, T., De Paoli, P., Gaidano, G., y Carbone, A. (1995). High frequency of EBV association with non-random abnormalities of the chromosome region 1q21-25 in AIDS-related Burkitt's lymphoma-derived cell lines. *Int J Cancer* 61, 370-4.

Pruneri, G., Fabris, S., Baldini, L., Carboni, N., Zagano, S., Colombi, M. A., Ciceri, G., Lombardi, L., Rocchi, M., Buffa, R., Maiolo, A. T., Neri, A. (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *Am J Pathol* 156, 1505-13.

Qiu, W. Q., de Bruin, D., Brownstein, B. H., Pearse, R., Ravetch, J. V. (1990). Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* 248, 732-5.

Rao, P. H., Houldsworth, J., Dyomina, K., Parsa, N. Z., Cigudosa, J. C., Louie, D. C., Popplewell, L., Offit, K., Jhanwar, S. C., y Chaganti, R. S. (1998). Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92, 234-40.

Rao, P. H., Murty, V. V., Gaidano, G., Hauptschein, R., Dalla-Favera, R., y Chaganti, R. S. (1993). Subregional localization of 20 single-copy loci to chromosome 6 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 16, 426-30.

Ravetch, J. V., y Lanier, L. L. (2000). Immune inhibitory receptors [In Process Citation]. *Science* 290, 84-9.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue [letter]. *Nature* 338, 383-4.

Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.

Richelda, R., Ronchetti, D., Baldini, L., Cro, L., Viggiano, L., Marzella, R., Rocchi, M., Otsuki, T., Lombardi, L.,

- Maiolo, A. T., Neri, A. (1997). A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene [see comments]. *Blood* 90, 4062-70.
- 5 Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J. C., y Markham, A. F. (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res* 18, 2887-90.
- 10 Ronchetti, D., Finelli, P., Richelda, R., Baldini, L., Rocchi, M., Viggiano, L., Cuneo, A., Bogni, S., Fabris, S., Lombardi, L., Maiolo, A. T., y Neri, A. (1999). Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma. *Blood* 93, 1330-7.
- 15 Rosenberg, C. L., Wong, E., Petty, E. M., Bale, A. E., Tsujimoto, Y., Harris, N. L., y Arnold, A. (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9638-42.
- Sawyer, J. R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S., y Barlogie, B. (1998). Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 91, 1732-41.
- 20 Sawyer, J. R., Waldron, J. A., Jagannath, S., Barlogie, B. (1995). Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 82, 41-9.
- 25 Shou, Y., Martelli, M. L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L. A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I. R., Bergsagel, P. L., y Kuehl, W. M. (2000). Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 228-33.
- 30 Stockinger, H., Gadd, S. J., Eher, R., Majdic, O., Schreiber, W., Kasinrerck, W., Strass, B., Schnabl, E., y Knapp, W. (1990). Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol* 145, 3889-97.
- Swerdlow, S. H., Yang, W. I., Zukerberg, L. R., Harris, N. L., Arnold, A., Williams, M. E. (1995). Expression of cyclin D1 protein in centrocytic/mantle cell lymphomas with and without rearrangement of the BCL1/cyclin D1 gene. *Hum Pathol* 26, 999-1004.
- 35 Tagawa, S., Doi, S., Taniwaki, M., Abe, T., Kanayama, Y., Nojima, J., Matsubara, K., y Kitani, T. (1990). Amylase-producing plasmacytoma cell lines, AD3 and FR4, with der(14)t(8;14) and dic(8)t(1;8) established from ascites. *Leukemia* 4, 600-5.
- 40 Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-41.
- 45 Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.
- Tusnady, G. E., Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Bio* 283, 489-506.
- 50 Unkeless, J. C., y Jin, J. (1997). Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol* 9, 338-43.
- 55 von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14, 4683-90.
- Whang-Peng, J., Knutsen, T., Jaffe, E. S., Steinberg, S. M., Raffeld, M., Zhao, W. P., Duffey, P., Condron, K., Yano, T., Longo, D. L. (1995). Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations with cytogenetic, histologic, immunophenotyping, and molecular studies. *Blood* 85, 203-16.
- 60 Willis, T. G., Zalcberg, I. R., Coignet, L. J., Wlodarska, I., Stul, M., Jadayel, D. M., Bastard, C., Treleaven, J. G., Catovsky, D., Silva, M. L., y Dyer, M. J. (1998). Molecular cloning of translocation tt(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood* 91, 1873-81.
- 65 Ye, B. H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S., y Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262, 747-50.

Yu, L. M., Peng, C., Starnes, S. M., Liou, R. S., y Chang, T. W. (1990). Two isoforms of human membrane-bound alpha Ig resulting from alternative mRNA splicing in the membrane segment. J Immunol 145, 3932-6.

5 Zhang, X. G., Gaillard, J. P., Robillard, N., Lu, Z. Y., Gu, Z. J., Jourdan, M., Boiron, J. M., Bataille, R., y Klein, B. (1994). Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. Blood 83, 3654-63.

Tercera Serie de Experimentos

10 El cromosoma 1q21 con frecuencia se ve alterado por translocaciones y duplicaciones en varios tipos de neoplasias malignas de células B, incluyendo mieloma múltiple, linfoma de Burkitt, linfomas de la zona marginal, y linfoma folicular. Para identificar los genes implicados en estas aberraciones, se clonó el punto de rotura cromosómica de una t(1;14)(q21;q32) en la línea celular de mieloma FR4. Una región de 300 kb que abarca el punto de rotura contiene al menos cinco genes adyacentes altamente relacionados que codifican moléculas receptoras de la superficie que son miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, y por lo tanto denominados IRTA (Asociados a la Translocación Receptores de Inmunoglobulina). Las diversas moléculas IRTA tienen de tres a nueve dominios extracelulares de la superfamilia de la inmunoglobulina y están relacionados con los receptores de Fc gamma. Tienen dominios transmembrana y citoplásmicos que contienen motivos de señalización de tipo ITIM y de tipo ITAM (IRTA-1, IRTA-3, IRTA-4). Experimentos de hibridación in situ muestran que todos los genes IRTA se expresan en el linaje de células B con distintos patrones específicos de la etapa de desarrollo: IRTA-1 se expresa en un patrón de células B marginales. IRTA-2 se expresa en centrocitos y células B más maduras. Como resultado de la translocación en FR4, IRTA-1 se rompe y produce un transcrito de fusión con el locus de inmunoglobulina. El gen IRTA-2, normalmente silencioso en centroblastos, se expresa en exceso en líneas celulares de mieloma múltiple y linfoma de Burkitt que portan anomalías en 1q21. Aquí, los datos sugieren que los genes de IRTA son moléculas reguladoras de las células B novedosas que también pueden tener un papel en la linfomagénesis.

25

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucléico que codifica la proteína receptora de inmunoglobulina, Asociada a la Translocación de Receptores de la superfamilia de Inmunoglobulinas, IRTA2, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1 a 18B-3.
 2. Una molécula de ácido nucléico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucléico es ADN.
 3. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que el ADN es ADNc.
 4. La molécula de ADN de la reivindicación 1, en la que el ADN es ADN genómico.
 5. La molécula de ácido nucléico de la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucléico es una molécula de ARN.
 6. La molécula de ADN de la reivindicación 2, en la que la molécula de ADN es de ADNc que tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en las Figuras 18B-1 a 18B-3.
 7. La molécula de ácido nucléico de la reivindicación1, unido operativamente a un promotor de la transcripción de ADN
 8. La molécula de ácido nucléico de la reivindicación 7, en la que el promotor comprende un promotor bacteriano, de levadura, de insectos, de planta o de mamífero.
 9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucléico de la reivindicación 7.
 10. El vector de la reivindicación 9, en el que el vector es un plásmido.
 11. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 10.
 12. La célula anfitriona de la reivindicación 11, en la que la célula es seleccionada del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de plata, una célula de insecto y una célula de mamífero.
 13. Un método para detectar una neoplasia maligna de células B o un tipo de neoplasia maligna de células B en una muestra de un sujeto en donde la neoplasia maligna de células B comprende una reordenación cromosómica 1q21, que comprende:
 - a) poner en contacto una muestra de ARN obtenida del sujeto con una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos contiguos capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica la proteína IRTA2 humana en condiciones que permiten la hibridación del ARN de la etapa (a) con la molécula de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con una secuencia única incluida dentro de la secuencia de un ARN aislado que codifica una proteína IRTA2 humana, en donde la molécula de ácido nucleico está marcada con un marcador detectable; y
 - b) detectar cualquier hibridación en la etapa (a), en donde la detección de hibridación indica la presencia de neoplasia maligna de células B o un tipo de neoplasia maligna de células B en la muestra.
- en el que la proteína IRTA2 humana comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1 a 18B-3.
14. El método de la reivindicación 13, en el que el marcador detectable es un isótopo radiactivo, enzima, colorante, biotina, una marca fluorescente o una marca quimioluminiscente.
 15. El método de la reivindicación 13, en el que la neoplasia maligna de células B es seleccionada del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitts, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas y células de linfoma folicular.
 16. El método de la reivindicación 15, en el que el linfoma de células B es un linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT).
 17. El método de la reivindicación 15 , en el que el linfoma de células B es un Linfoma no Hodgkin.
 18. Un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia capaz de hibridar específicamente con una molécula de ARNm que codifica una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar la expresión en exceso de la molécula de ARNm, en donde la proteína IRTA2-b comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1-18B-3.

19. Un anticuerpo dirigido a una proteína IRTA2 humana purificada, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las Figuras 18B-1 a 18B-3.

20. El anticuerpo de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

21. El anticuerpo de la reivindicación 20, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo monoclonal humanizado.

22. El anticuerpo de la reivindicación 19, en el que el anticuerpo es conjugado con un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, una toxina, un toxoide o un agente quimioterapéutico.

23. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad del anticuerpo de la reivindicación 19 efectiva para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA2 con el fin de evitar el crecimiento de las células cancerosas y un portador farmacéuticamente aceptable.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, en el que las células cancerosas son seleccionadas del grupo que consiste en linfoma de células B, linfoma de células del manto, mieloma múltiple, linfoma de Burkitts, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas y células de linfoma folicular.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, en el que las células de linfoma de células B son células de linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT).

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, en el que las células de linfoma de células B son células de Linfoma no Hodgkin.

27. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad del oligonucleótido de la reivindicación 18 efectiva para evitar la expresión en exceso de una proteína IRTA2 humana y un portador farmacéuticamente aceptable.

28. Un método de diagnóstico de una neoplasia maligna de células B que comprende una reordenación cromosómica 1q21 en una muestra de un sujeto que comprende:

a) poner en contacto una muestra obtenida del sujeto con el anticuerpo de la reivindicación 19 capaz de unirse específicamente con una proteína IRTA2 humana sobre la superficie celular de una célula cancerosa en condiciones que permiten la unión del anticuerpo con la proteína IRTA2 humana sobre la superficie celular de la célula cancerosa, en donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable; y

b) detectar cualquier unión en la etapa (a), en donde la detección de la unión indica un diagnóstico de neoplasia maligna de células B en la muestra.

29. El método de la reivindicación 28, en el que la neoplasia maligna de células B es seleccionada del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de Burkitts, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas y células de linfoma folicular.

30. El método de la reivindicación 29, en el que el linfoma de células B es un linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT).

31. El método de la reivindicación 29, en el que el linfoma de células B es un Linfoma no Hodgkin.

32. Uso de una cantidad de anticuerpo anti-IRTA2 eficaz para unirse a las células cancerosas que expresan una proteína IRTA2 humana con el fin de evitar el crecimiento de las células cancerosas para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un sujeto que tiene un cáncer de células B, en donde la proteína IRTA2 humana comprende la secuencia de aminoácido expuesta en las Figuras 18B-1 a 18B-3.

33. El uso de la reivindicación 32, en el que el anticuerpo anti-IRTA2 es un anticuerpo monoclonal.

34. El uso de la reivindicación 33, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo monoclonal humanizado.

35. El uso de la reivindicación 32, en el que el anticuerpo anti-IRTA2 es un anticuerpo policlonal.

36. El uso de la reivindicación 32, en el que el cáncer de células B es seleccionado del grupo que consiste en linfoma de células B, mieloma múltiple, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitts, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas y células de linfoma folicular.

37. El uso de la reivindicación 36, en el que el linfoma de células B es un linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT).

5 38. El uso de la reivindicación 36, en el que el linfoma de células B es un Linfoma no Hodgkin.

10 39. Uso de una cantidad del oligonucleótido de la reivindicación 18 efectiva para evitar la expresión en exceso de la proteína IRTA2 humana, así como para detener el crecimiento celular o inducir la muerte celular de las células cancerosas que expresan la proteína o proteínas IRTA2 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un sujeto que tiene cáncer de células B.

15 40. El uso de la reivindicación 39, en el que el cáncer de células B es seleccionado del grupo que consiste en linfoma de células B, linfoma de células del manto, mieloma múltiple, linfoma de Burkitts, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas y células de linfoma folicular.

41. El uso de la reivindicación 40, en el que el linfoma de células B es un linfoma de células B de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa (MALT).

20 42. El método de la reivindicación 40 , en el que el linfoma de células B es un Linfoma no Hodgkin.

FIGURA 1

FIG. 1A

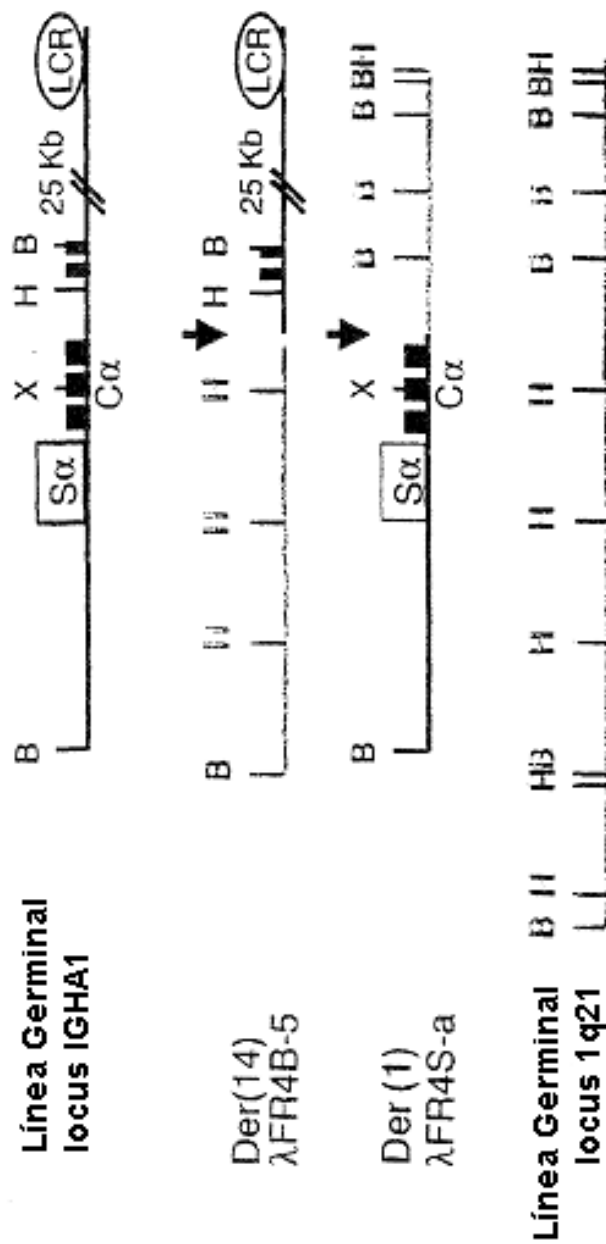


FIG. 1B

Chr 1: GGGCTGACAGCACTTTCTCTACTAGTTCACTTAACCTTTATCCTGGTAACCTGGGAGACAACTGTCTTAAAGTAACGGAAGGAAA
 der14: GGGCTGACAGCACTTTCTCTACTAGTTCACTTAACCACTGCTGTACGGGGCACAGTGGGCACAGGTGCACACTCACA
 Chr 14: TCCCACTGACGCATGCAAGGAAGGGGACCTCCCCCTTAACCACTGCTGTACGGGGCACAGTGGGCACAGGTGCACACTCACA

FIGURA 2A

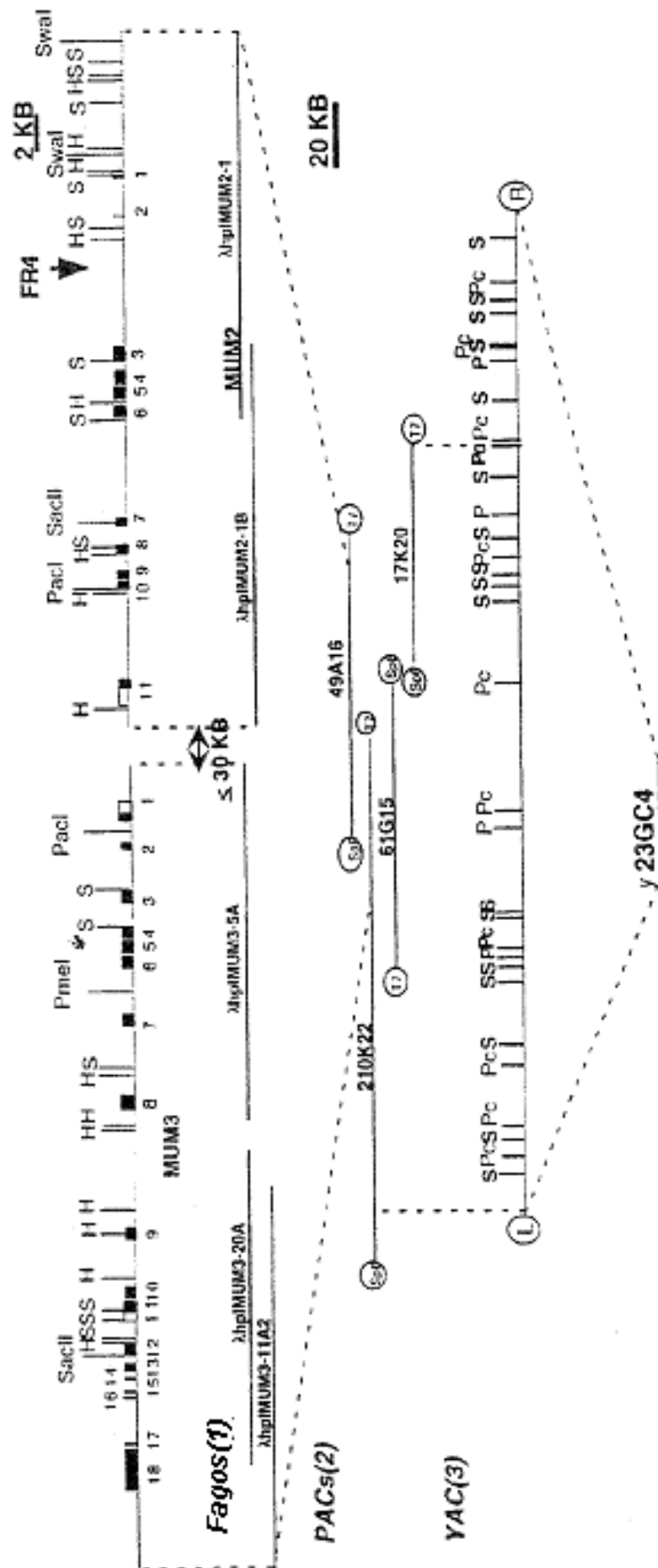


FIGURA 2B

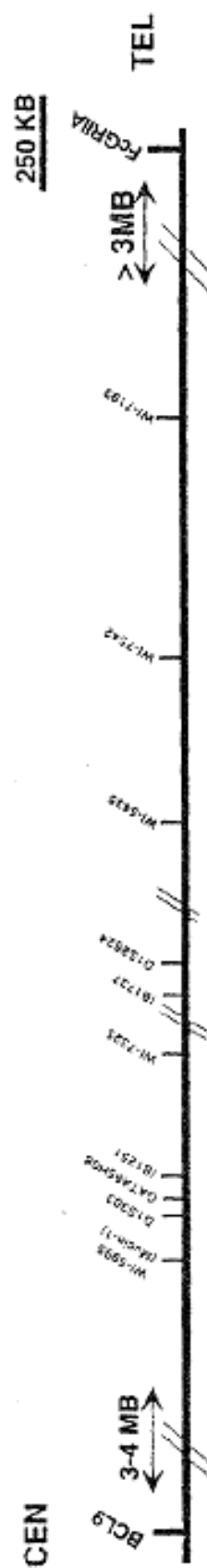


FIGURA 3



FIG. 3B

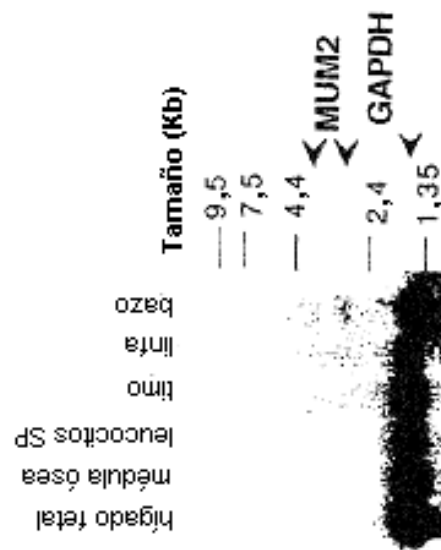


FIG. 3C

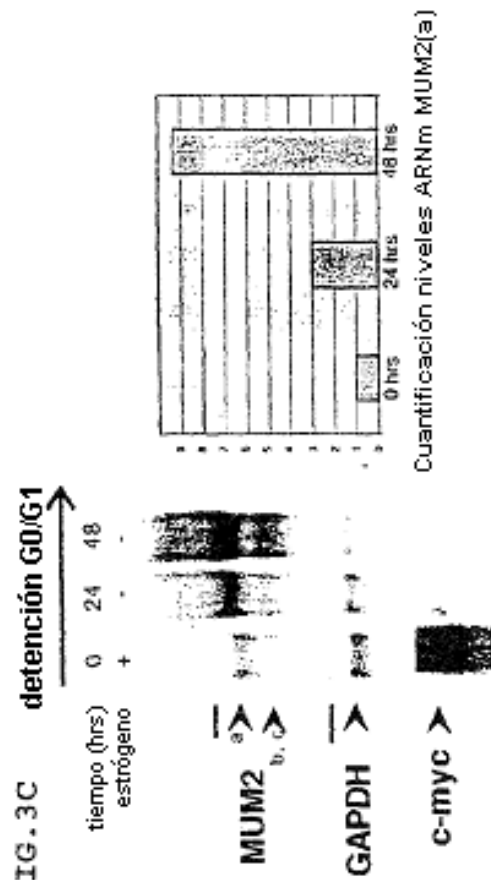


FIGURA 4

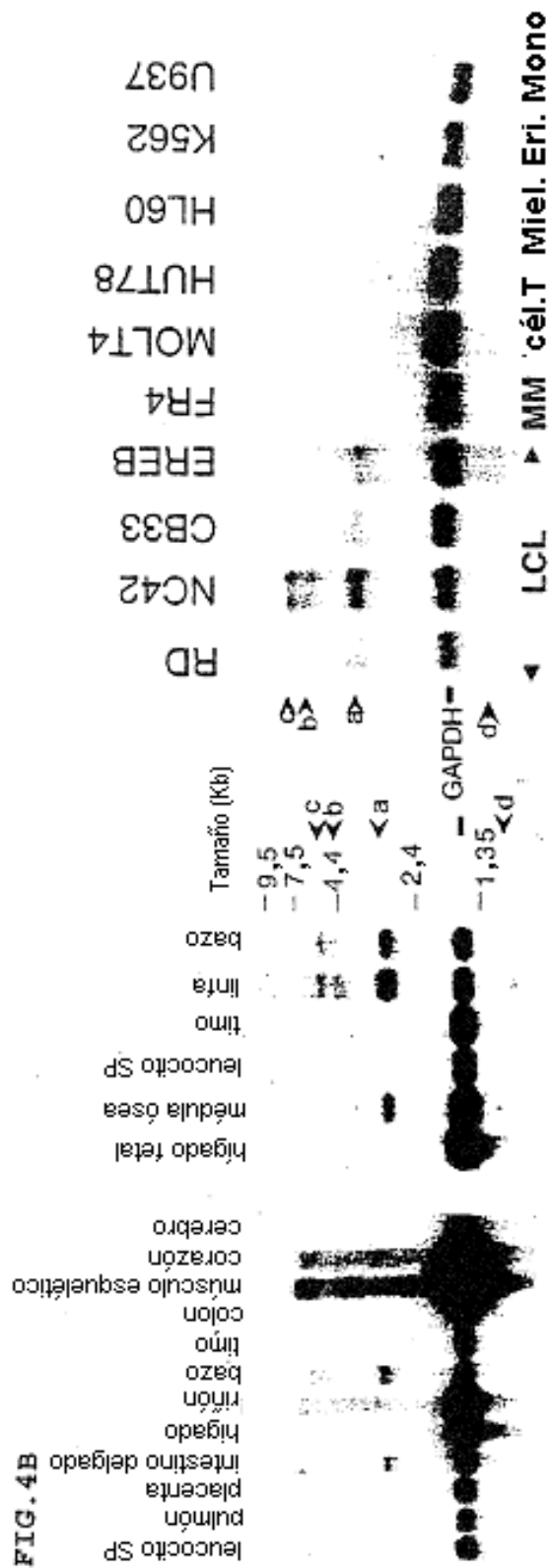
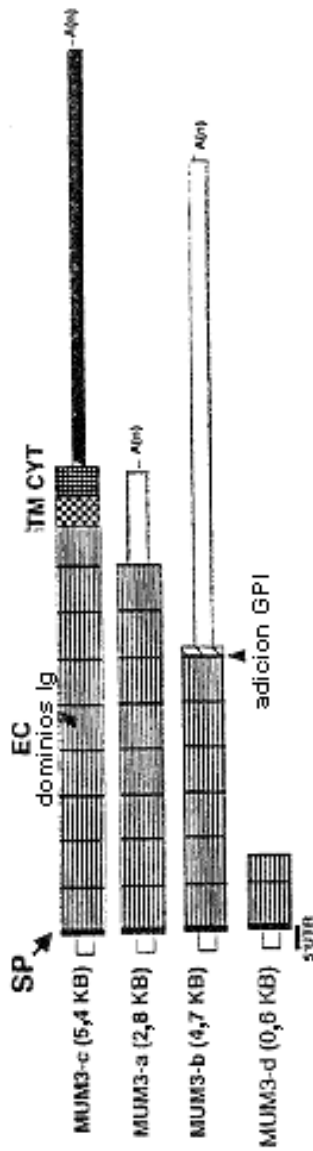


FIGURA 5

1 CTCACATCAGCTTTATGTCAGAGAAGAAGCTTACTGAGCTCACTGCTGGTGGTGTAGGCAAGTCTGCTTTGGCAA
 M L L W A S
 78 TCTGGGCTGACCTGGCTTGTCTCTCAGAACTCCTTCTCCAACCTCGAGCAGGCTTCCATGCTGCTGGGCGTCC
 L L A F A P V C Q S A A A H K P V I S V H P P W T 12
 155 TTGCTGGCCTTTGCTCCAGTCTGTGGACAACTGTCAGCTGCACACAAACCTGTGATTCCGCTCCATCCTCCATGGAC
 T F F K G E R V T L T C N G F Q F Y A T E K T T W Y 58
 212 CACATTCTTCAAAGGAGAGAGTGTACTCTGACTTGCATATGATTTTCAGTTCTATGCAACAGAGAAAAACAATGGT
 H R H Y W G E K L T L T P G N T L E V R E S G L Y 93
 309 ATCATCGGCACTACTGGGAGAAAAAGTTGACCTGACCCAGGAAACACCTCGAGGTTGGGAATCTGGAGCTGTAC
 R C Q A R G S P R S N P V R L L F S S D S L I L Q A 109
 386 AGATCCAGGCGCCGGGCTCCCAAGTAACCTGTGGCTTGTCTTTTCTTCAGACTCCTTAATCTGCAGGC
 P Y S V F E G D T L V L R C H R R R K E K L T A V K 135
 463 ACCATATTCTGTTTGAAGGTGACACATTGGTTCTGAGATGCCACAGAAGAAGGAAAGAGAAATGACTGCTGTGA
 Y T W N G N I L S I S N K S W D L L I P Q A S S N 160
 540 AATATACCTGGAATGGAACATTCTTCCATTCTAATAAAGCTGGGATCTTCTATCCCAAGCAAGTTCAAAT
 N N G N Y R C I G Y G D E N D V F R S N F K I I K I 186
 617 AACCAATGGCAATTATCGATGCATTGGATGGAGATGAGAATGATGTAATTAGATCAAATTCAAATTAATTAAT
 Q E L F P H P E L K A T D S Q P T E G N S V N L S C 212
 694 TCAAGAACTATTTCACATCCAGAGCTGAAAGCTACAGACTCTCAGCCTACAGAGGGGAATTCTGTAAACCTGAGCT
 E T Q L P F E R S D T P L H F N F F R D G E V I L 237
 771 GTGAACACAGCTTCTCCAGAGCGGTGAGACACCCCACTTCACTTCACTTCTTCAGAGATGGCGAGGTGATCTCTG
 S D W S T Y P E L Q L P T V W R E N S G S Y W C G A 263
 848 TCAGACTGGAGCAGTACCCGGAACCTCCAGCTCCCAACCGTCTGGAGAGAAACTCAGGATCCTATTGGTGTGGTGC
 E T V R G N I H K H S P S L Q I H V Q R I P V S G V 289
 925 TGAACAGCTGAGGGGTAACATCCACAAGCACAGTCCCTCGCTACAGATCCATGTGCAGCGGATCCCTGTGTCTGGGG
 L L E T Q P S G Q A V E G E M L V L V C S V A E 314
 1002 TGCTCCTGGAGACCCAGCCCTCAGGGGGCCAGGCTGTTGAAGGGGAGATGCTGGTCTTGTCTGCTCCGCTGGCTGAA
 G T G D T T F S W H R E D M Q E S L G R K T Q R S L 340
 1079 GGCACAGGGGATACACATTCTCTGSCACCGAGAGGACATGACAGAGAGTCTGGGAGGAAAACTCAGCCTCCCT
 R A E L E L P A I R Q S H A G G Y Y C T A D S N Y G 366
 1156 GAGAGCAGAGCTGGAGCTCCCTGCCATCAGACAGAGCCATGCAGGGGGATACTACTGTACAGCAGACACAGCTACG
 P V Q S M V L N V T V R E T P G N R D G L V A A G 391
 1233 GCCCTGTCAGAGCATGGTGTGCTGAATCTCACTGTGAGAGAGACCCAGGCAACAGAGATGGCTTGTGCGCCCGGGA
 A T G G L L S A L L L A V A L L F H C W R R R K S G 417
 1310 GCCACTGGAGGGCTGCTCAGTGTCTTCTCCTGGCTGTGGCCCTGCTGTTCACTGCTGGGCTCGGAGGAAAGTCAGG
 V G F L G D E T R L P P A P G P G E S S H S I C P A 443
 1387 AGTTGGTTTCTTGGGAGACGAAACAGGCTCCCTCCCGCTCCAGGCCCAGGAGAGTCCCTCCCATTCATCTGCCCTG
 Q V E L Q S L Y V D V H P K K G D L V Y S E I Q T 468
 1464 CCCAGGTGGAGCTTCACTGCTGTATGTTGATGTACACCCAAAAAGGGAGATTGGTATACCTCTGAGATCCAGACT
 T Q L G E E E E A N T S R T L L E D K D V S V V Y S 494
 1541 ACTCAGCTGGGAGAAGAGGAAGCTAATACCTCCAGGACACTTCTAGAGGATAAGGATGTCTCAGTTGTCTACTC
 E V N T Q H P D N S A G K I S S K D E E S * 515
 1618 TGAGGTAAGACACACACCTCAGATAACTCAGCTGGAAGATCAGCTCTAAGSATGAAGAAAGTTAAGAGATGAAG
 1695 AGTTACGGGAACGCTCTACTCATGTGATTCTCCCTTGTCCAAAGTCCCAGGCCCAGTGCAGTCTTCCGGCACCTG
 1772 GAATGATCAACTCATTCCAGCTTTCTAATCTTCTCATGCATATGCATTCACTCCAGGAATACTCATTCTGCTACT
 1849 CTGATGTTGGGATGGAATGSCCTCTGAAAGACTTCACTAAAAATGACCAGGATCCACAGTTAAGAGAAGACCTGTAG
 1926 TATTGCTGTGGGCTGACCTAATGCATTCCCTAGGGCTGTGCTTTAGAGAAGGGGGATAAGAGAGAGAGAAGGACTGT
 2003 TATGAAAAACAGAACCAAAATTTGGTGAATTGGGATTTGCAGAGATGAAAAAGACTGGGTGACCTGGATCTCTGC
 2080 TTAATACATCTACAACCATTTGTCTCACTGGAGACTCACTTGCATCAGTTTGTTTAACTGTGAGTGGCTGCACAGGCA
 2157 CTGTGCAAAACAATGAAAAGCCCTTCACTTCTGCTGACACAGCTTACACTGTGAGGATTCAGTTGCAGATTAAAGAA
 2234 CCCATCTGGAATGGTTTACAGAGAGAGGAATTTAAAGAGGACATCAGAAGAGCTGGAGATGCAAGCTCTAGGCTGC
 2311 GCTTCCAAAAGCAAAATGATAATTATGTTAATGTCAATTAGTGACAAAGATTTCACATTTAGAGAAAAGAGACACAAA
 2388 TATAAAATTAAGAACTTAAGTACCAACTCTCAAAACTAAATTTGAACCTTAAATATTAGTATAAACTCATAATAAA
 2465 CTCTGCCTTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 6a

1 CGGTGCAGTGTCTGCTGATGATCAAGTCCAAACCTGTTTGGAAATGAGGAAACTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTG
 H L L L W V I L L V L A P V S G V Q F A R T P R 22
 81 GTGGTCCAGGTCTTCATGCTGCTGTGGGTGATATTACTGGTCTGGCTCTGTGAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAG
 P I I F L Q P P W T T V F Q G E R V T L T C K G F R F 49
 161 GCCCATTATTTTCTCCAGCTCCATGGACACAGTCTTCCAAAGGAGAGAGTGAACCTCACTTGCAAGGATTTTCGCT
 Y S P Q K T K W Y H R Y L G K E T L R E T P D N I L 75
 241 TCTACTCACCACAGAAACAAATGGTACCATGGTACCTTGGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCAGACAATATCCTT
 E V Q E S G E Y R C Q A Q C S P L S S P V H L D F S S 102
 321 GAGGTTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCAGGCTCCCTCTAGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTCTTC
 A S L I L Q A P L S V F E G D S V V L R C R A K A E V 129
 401 AGCTTCGCTGATCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGTGCCTGGGCAAGGCGGAAG
 T L N N T I Y K N D N V L A F L N K R T D F H I P H 155
 481 TAACACTGAATAATCTATTACAGAATGATAATGCTCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCATATTCCTCAT
 A C L K D A Y R C T G Y K E S C C P V S S N T V K 182
 561 GCATGCTCAAGGACAAATGGTGCATATCTGCTGACTGATATAAGGAAAGTTGTCCTCTTCTTCCATACAGTCAA
 I Q V Q E P F T R P V L R A S S F Q P I S G N P V T L 209
 641 AATCCAAAGTCCAAAGGCCATTTACAGCTCCAGTGTGAGAGCCAGCTCCTCCAGCCCATCAGCGGGAACCCAGTGACCC
 T C E T Q L S L E R S D V P L R F R F F R D D Q T L 235
 721 TGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTCTAGAGAGGTGAGATGTCCGCTCCGGTTCCTCTCAGAGATGACCCAGCCCTG
 G L G W I L Q A P L S V F E G D S V V L R C R A K A E V 262
 801 GGATTAGGCTGGAGTCTCTCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAAAGATTGAGGTTCTACTGGTGAAGGC
 A T N P H S V I S D S P R S W I Q V Q I P A S H P V L 289
 881 AGCAATCAATGCTCAGAGCTCATATCTGACAGCCGAGATCTTGGATACAGGTGCAGATCCCTGCACTCATCTCTCTC
 T L S P E K A L N F E G T K V T L H C E T Q E D S L 315
 961 TCACTCTCAGCCCTGAAAGGCTCTGAATTTGAGGGAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTG
 R T L Y R F Y H E G V P L R H K S V R C E R G A S I S 342
 1041 CGCACTTGTAGAGTTTATCATGAGGGTGTCCCTGTGAGGCACAAGTCACTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCCATCAG
 F S L T T E N S G N Y V C T A D N G L G A K P S K A V 369
 1121 CTCTCTCAGTACTACAGGAATTCAGGGAATCTACTGACAGCTGACAAATGGCTTGGCGCCAGCCAGTAAGGCTG
 S L S V T V P V S H P V L N L S S P E D L I F E G A 395
 1201 TGAGCTCTCAGTCACTGTCTCCGCTGTCTCATCTCTCTCAAGCTCAGCTCTCTGAGGACCTGATTTTGGAGGGAGCC
 K V T L H C E A Q R G S L P I L Y Q F H H E D A A L E 422
 1281 AAGGTGACACTTCACTGTGAAGCCAGAGAGGTTCACCTCCCATCTGTACAGTTTCACTATGAGGATCTGCTCCCTGGA
 R R S A N S A G G V A I S F S L T A E H S G N Y V C 449
 1361 CGCTAGGTCCGCAACTGTCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTGACTCCAGAGCATTCAGGGAATCTACTGCA
 A D N G F G P Q R S K A V S L S I T V P V S H P V L 475
 1441 CAGCTGACAAATGCTTGGCCCCAGGCGGAGTAAAGGCTGAGGCTCTCCATCACTGTCTCTCTCATCTCTCTCTC
 T L S S A E A L T F E G A T V T L H C E V Q R G S P 502
 1521 ACCTCTCAGCTCTGCTGAGGCGCTGACTTTTGAAGGAGGCTGACACTTCACTGTGAGTCCAGAGAGGTCTCCCA
 I L Y Q F Y H E D M P L W S S S T P S V G R V S P S 529
 1601 AATCTTATACCACTTTTATCATGAGGACATGCCCCGTGTGGAGCAGCTCAACACCCCTGTGCGGAAGAGTGTCTCTCAGCT
 S L T E G H S G N Y V C T A D N G F G P Q R S E V V 555
 1681 TCTCTCTGACTGAGGAGCATTCAGGGAATTAATCTGACAGCTGACAATGGCTTTGGTCCCGAGCCAGTGAAGTGTG
 S L F V T V P V S R P I L T L R V P R A Q A V V G D L 582
 1761 AGCCTTTTGTCACTGTCTCCAGTGTCTCCCGCATCTCAGCTCAGGCTTCCAGGCGCCAGGCTGTGGTGGGGGACCT
 L E L H C E A P R G S P P I L Y N F Y H E D V T L G 5609
 1841 GCTGGAGCTTCACTGTGAGGCGCCAGAGAGGCTTCTCCCAATCTCTACTGGTTTATCATGAGGATGTACCCCTGGGSA
 S S A P S G G E A S F N L S L T A E H S G N Y S C E 635
 1921 GCAGCTCAGCCCCCTCTGAGGAGGAAGCTTCTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCGAAACTACTCATGTGAG
 A N N G L V A Q H S D T I S L S V I V P V S R P I L T 662
 2001 GCGCAACATGSCCTAGTGGCCGAGCAGTGCAGACAATATCACTCAGTGTATAGTTCAGATATCTCGTCCCATCTCAG
 F R A P R A Q A V V G D L L E L H C E A L R G S S P 1589
 2081 CTTCAGGCTCCAGGCGCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTGCTGAGCTTCACTGTGAGGCGCTGAGAGGCTCTCCCGAA
 L Y W F Y H E D V T L G K I S A P S G G G A S F N L 715
 2161 TCTCTACTGGTTTATCATGAAGATGTACCTTGGTAAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCTCTTCAACCTC
 S L T T E H S G I Y S C E A D N G L E A Q R S E M V T 742
 2241 TCTCTGACTACAGAACATTTGGAATCTACTCTGTGAGGCGAGCAATGGTCTGAGGCGCCAGCGCAGTGAATGTGTGAC
 L K V A G E W A L P T S S T S E N 759
 2321 ACTGAAAGTTGAGGTGAGTGGGCGCTGCCACAGCAGCAGATCTGAGAAGTACTGTGCTGTCTCTCTGAGCTGA
 2401 AAATGGAGCCAGAGCTCTCAGGCTGTGCTGTGTGTCATCCAGCAGACTTCTCTGCTGAGAACTCTCTCTGTG
 2481 AAAGTCTCGGATCTCTTGTGTATGCTTCCAGGAATCTGATGTTTCCAGCAGTCTCTTGAAGATGATCAAAGCAGCTC
 2561 ACTAAAGATGCAATAGACTTTTGAAGCAAACTATATTGAACTGAAATATTACATGAAATGAAACCAAGAA
 2641 ATTCTGAGCATATGTTCTGTCCGTAGAAAGGATTAAGCTGTTTCTGTGCGGATTTCTCTCATGACTTCTAAGAA
 2721 GCTCTACTCTGTGAGTCTTCTGATTAAGGATTAAGTGTCTTCACTTGAAGATCTTATGTTAAGGA
 AAAAA

FIGURA 6c-2

E V K V A S T P V S G S L F L A S S A P H R * stop 977

```

2961 GAAGTTAAGGTGGCGTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTGTTCTTGGCTTCCCTCAGCTCCTCAGAGATGAGTCCACACGTC
3041 TCTCCAACTGCTGTTTCAGCCCTCTGCACCCCAAGTTCCTCTTGGGAGAGAGCAGCATTGAAGTGGGAAGATTTAGGCT
3121 GCCCCAGACCATATCTACTGGGCTTTGTTTACATGTCTCTCATTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGGGGCTGCTGGACTG
3201 TCACCTGTTTCCCAAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTTAATCCAGTGGCAAGGTGCTCCCACTCCAGGGGCCAGCAC
3281 ATCTCTGGATTTCCTTAGTGGGCTTCAGCTGTGGTGTGCTGTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCCACAGAGGGGGTC
3361 TTACCACACAAAAGGAGAGTGGGCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCCTAACAGCTCAGGTGCTCTTAACTCCGACACAG
3441 AGTTCTGCTTTTGGGTGGATGCATTTCCTCAATTGTCTATCAGGCTGCTGGGGCTACTGCAAGTGTGCTGCCAATGGGACAG
3521 CACACAGCCTGTGCACATGGGACATGTGATGGGTCTCCCAAGGGGGCTGCATTTCACACTCCTCCACCTGTCTCAAACT
3601 CTAAGGTGGGCACTTGACACCAAGGTAACCTCTCTCTGCTCATGTGTGAGTGTCTACCTGCCCAAGTAAGTGGCTTTCA
3681 TACACCAAGTCCCGAAGTTCTTCCCATCTAACAGAGTAACCCAGCAAGTCAGGCCAGGAGGACCAGGGGTGCAGACA
3761 GAACACATACTGGAAACACAGGAGGTGCTCAATTACTATTGACTGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAGAAAAC
3841 TGTGGGTAAATCAAACTGGCATAAATCCAGTGCACTCCCTAGGAAATCCGGGAGGTATTCTGGCTTCTAAGAAACAAGC
3921 GAAGAGAAAGGAGCTTGGATGAAGAACTGTTTCAAGCAAGAAAGGGCTTCTTACACTTTTATGTCTTGTGGATCACCT
4001 GAGGATCTGTGAAATACAGATACTGATTCAAGTGGGTCTGTGTAGAGCCTGAGACTGCCATTCTAACATGTTCCCAAGGG
4081 ATGCTGATGCTGCTGGCTTGGGACTGCACTGCATGCATGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGA
4161 ATGTGTGGTCTCTGGCTGCCAGGGCCCACTCGGTTTACACGGATCGTGTCTCTCTGGCCAGGCTTTGGCCACAGCAC
4241 CACCACTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTCTGTGACATGTTGGCTTTCATCAGCCACCTTGGGAAGCGGAAAGTAGC
4321 TGCCACTATCTTTGTTTCCCACTCAGGCTCAGACTTTCCCATGAAAAGGGTGAAATGTATATAAAGTGGCCCTCTOC
4401 ATTACAGATTGTTCTCCCATCTCTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCATCAGCTTATCTTGATC
4481 TTTGCTCCCAAGTGGATTGTACAGTGTATGACTTTTAAGCCCCACGGCCCTGAAATAAAAATCCTTCCAAAGGGCATTTGGAAGC
4561 TCACTCCCACTGAACCATGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTGAGGGCTTGGCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGCTGCC
4641 CAACCTTTCAAGGAGGAAACAGACACCTGAGACAGGAGCTGTATGCAAGCCAGTGCAGGCTTGCAGAGGACAAAGCTG
4721 GAGGCATTTGTCACTACAGATATGCAACTAAAATAGAGCTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCAAGGGAGGGCGCTTTT
4801 TTAGGCTTAGTTGAAAGTCAAGAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTAAAGAAAAAATCTGCTCAGACTCTGTT
4881 CTGGAGGTACATCACCACAAAGCTCAGGCTTATGAGTTCTGAGAGGTGGAGGCCACAGGCTCAAAAGAGGAAAT
4961 TAGAATTTCTCATTGGGAGATAGGTTACCCCATCCAGAAATGATAACTGCACAGTGGCAGAAACAACTCCACCTAAT
5041 GTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAGGCTTGAATGTAAACAAAGGGCTTATTCTTCTCAAGTAAGGGGGAAGTCT
5121 GCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTCTGCTTTCAGAGCGAAACTGAAAAATGGCTCTTCTGGGTCTTGAAGTGTCTGGC
5201 ATATGGACTGAAAGAACTATGCTATTGGATCTCTGGATCTCCAGCTTCTGACTGCAGATCTTGAGATATGTAGGCT
5281 CTACAGTCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATCTTTC

```


FIGURA 8A

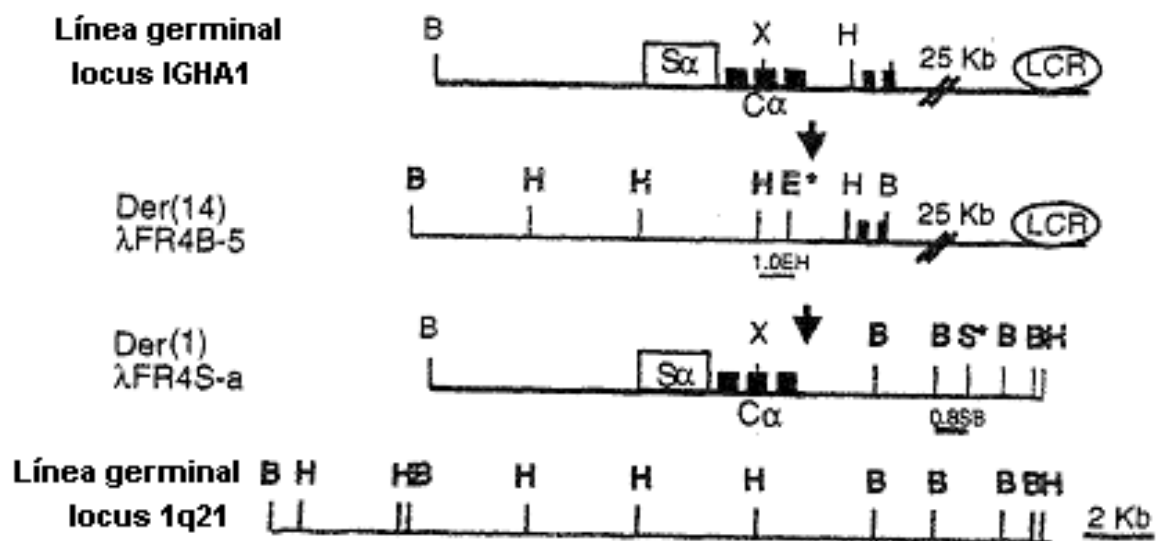


FIG. 8B

Chr 14 TCCCACTGACGCATGCAGGAGGGGACCTCCCTTAACCACTGCTCTGTACGGGGCACGTGGGCACAGTGCACACTCACACTCACA
 Der (14) GGCCGTGACAGCAACTTTTCTTCTACTAGTTCACTTAA-CACTGCTCTGTACGGGGCACGTGGGCACAGTGCACACTCACACTCACA
 Chr 1 GGCCGTGACAGCAACTTTTCTTCTACTAGTTCACTTAACTTTATCCTGGTAAGTGGGAGACACCTGTCTTAAGTAACTGAAGGGAAA
 Chr 1 GGCCGTGACAGCAACTTTTCTTCTACTAGTTCACTTAACTTTATCCTGGTAAGTGGGAGACACCTGTCTTAAGTAACTGAAGGGAAA
 Der (1) TCCCACTGACGCA---GGAAGGATCTTAACTTTATCCTGGTAAGTGGGAGACACCTGTCTTAAGTAACTGAAGGGAAA
 Chr 14 TCCCACTGACGCAATGCAGGAGGGGACCTCCCTTAACCACTGCTCTGTACGGGGCACAGTGGGCACAGTGCACACTCACACTCACA

8c



FIGURA 9

FIG. 9A

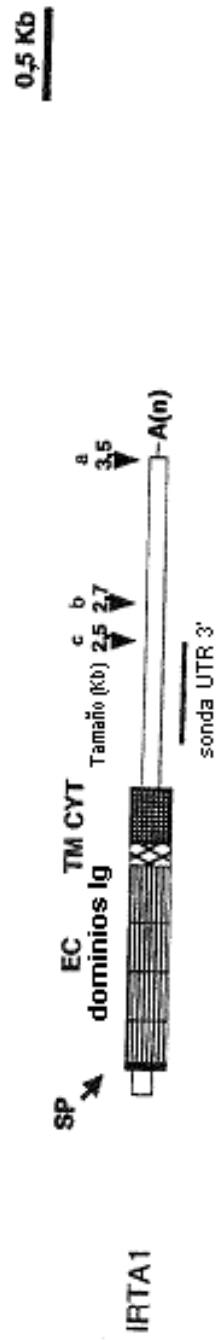


FIG. 9B

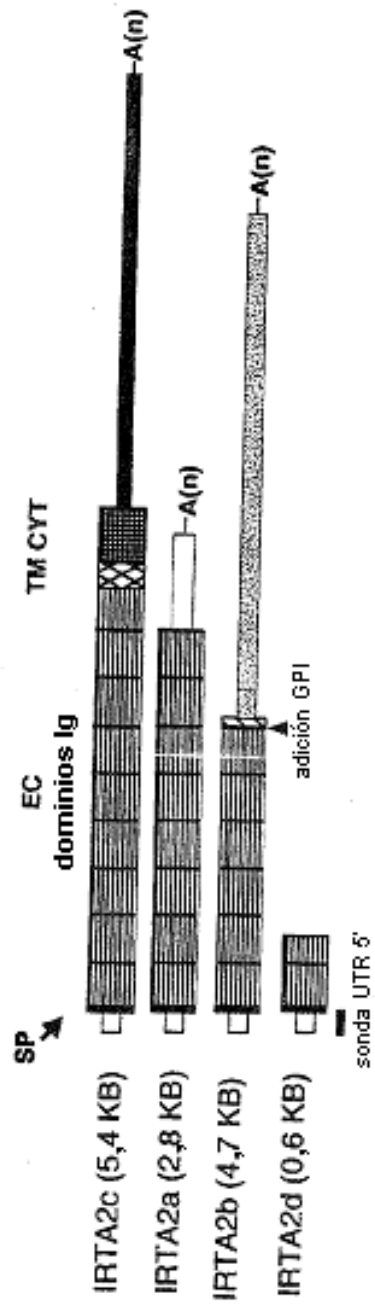


FIGURA 11A

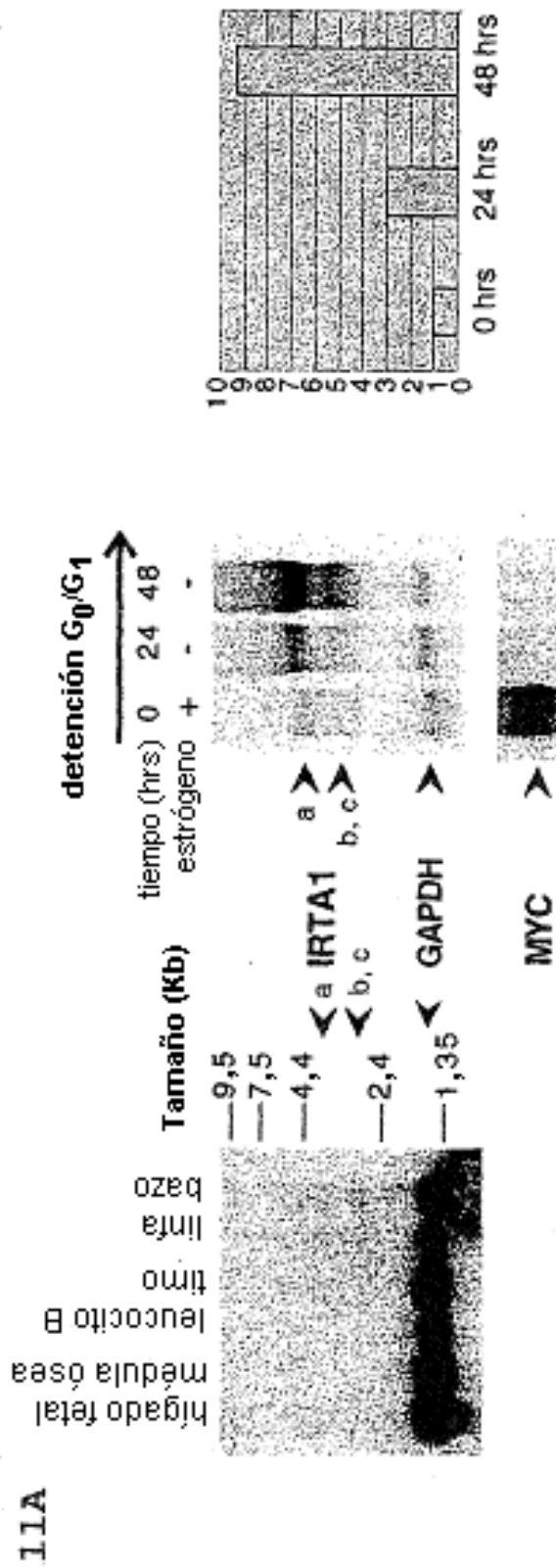


FIGURA 11B1-B4

11B1-4

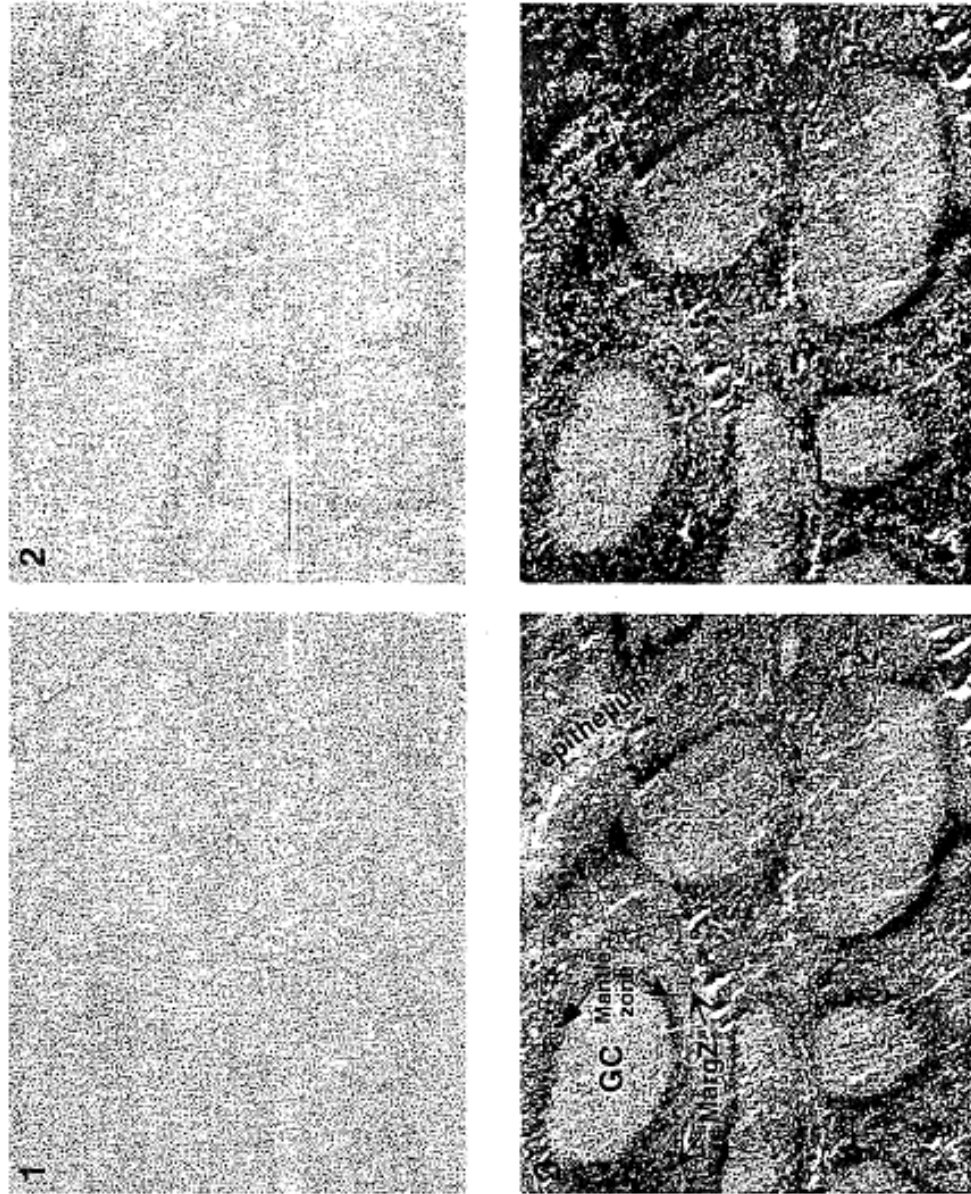


FIGURA 12A

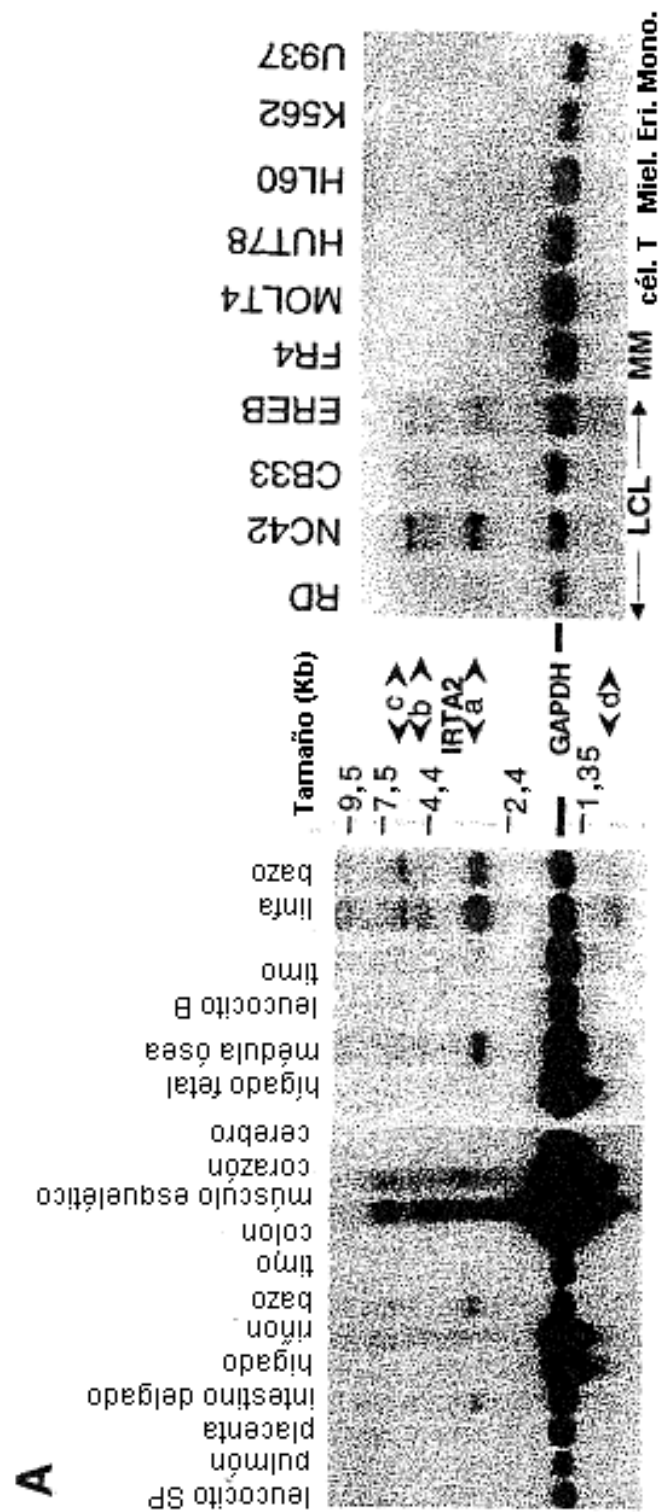


FIGURA 12B1-B4

B

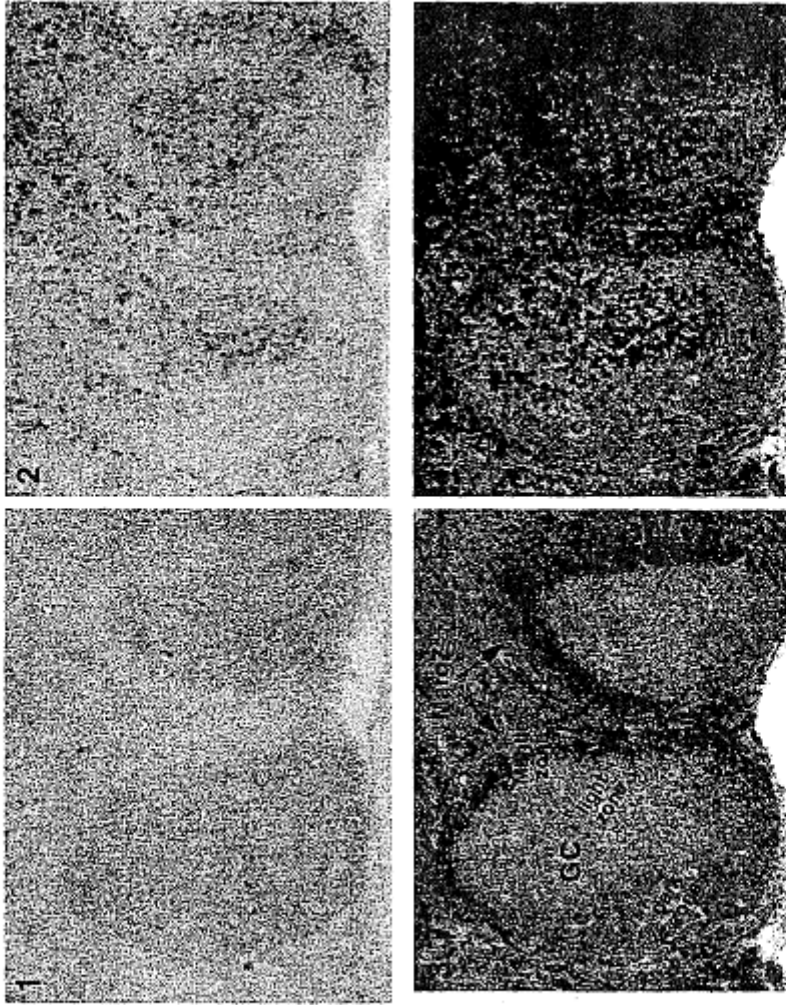


FIGURA 14

FIG. 14A

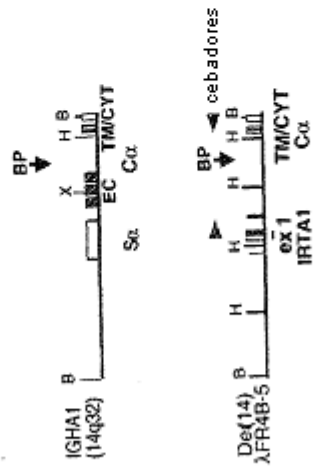


FIG. 14B

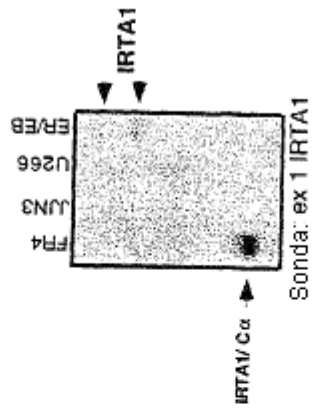


FIG. 14D

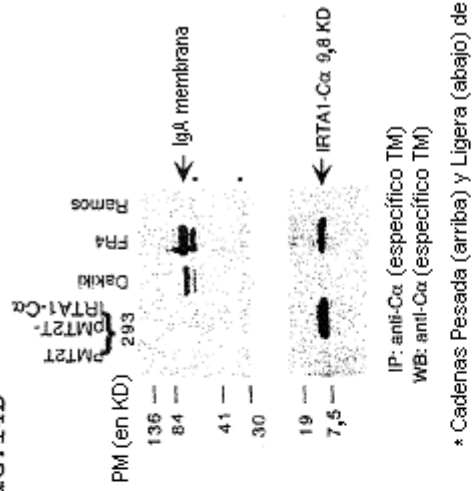
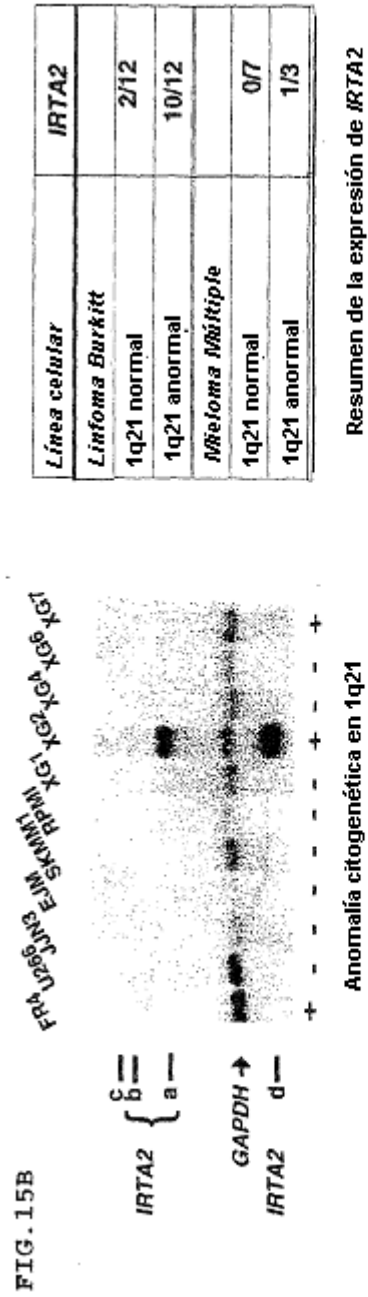
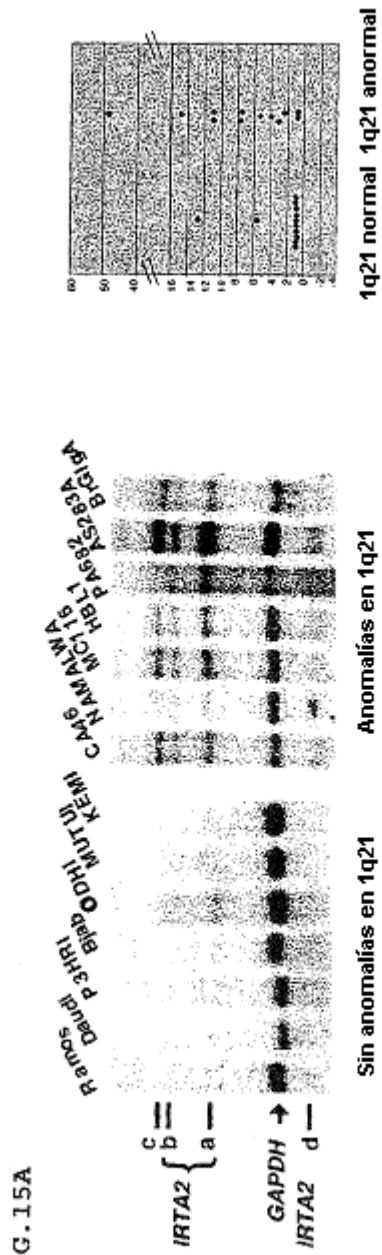


FIG. 14C



FIGURA 15



<i>Linea celular</i>	<i>IRTA2</i>
<i>Linfoma Burkitt</i>	
1q21 normal	2/12
1q21 anormal	10/12
<i>Mieloma Múltiple</i>	
1q21 normal	0/7
1q21 anormal	1/3

FIGURA 16 - 1 -16 - 4
Expresión de IRTA1 en tejido linfóide normal

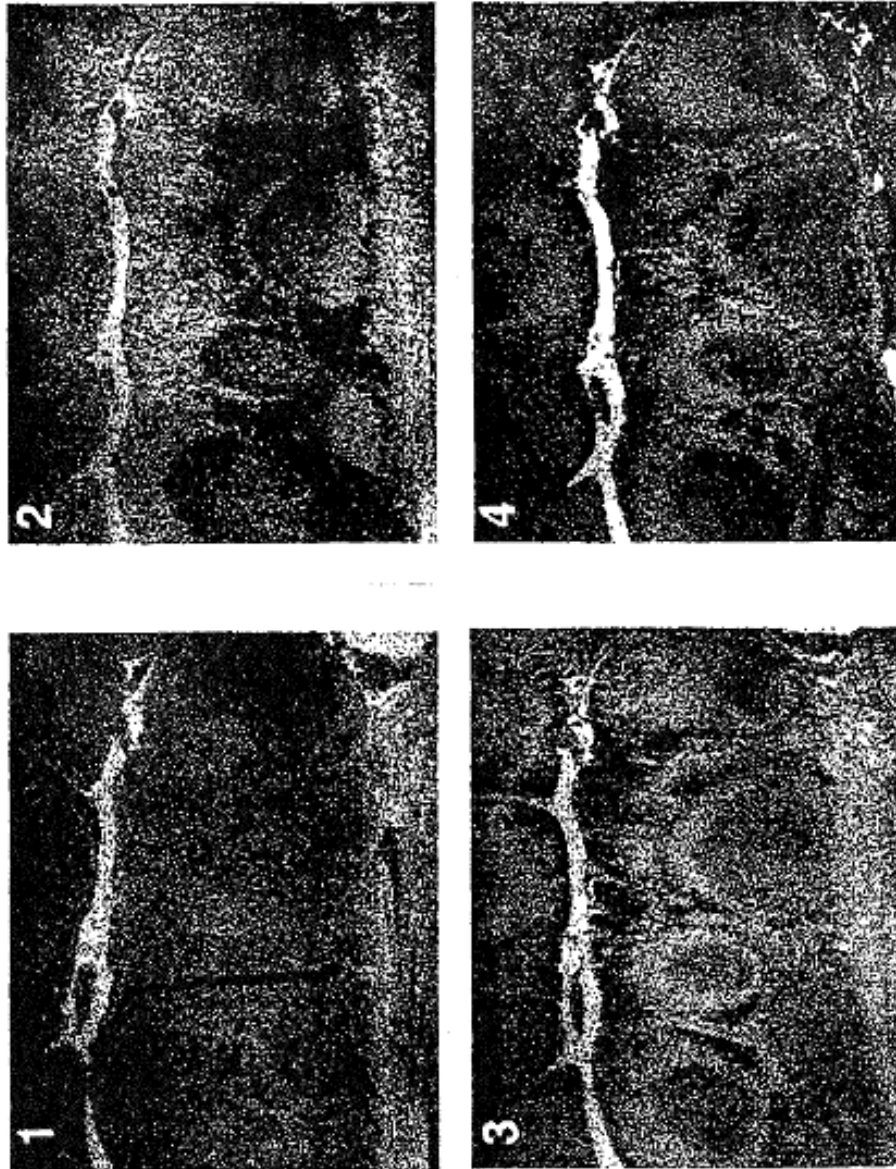


FIGURA 17

Expresión de IRTA1 en linfoma de células T de Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa del Estomago



[illegible]

FIGURA 18B-2

[illegible]

FIGURA 18B - 3

```

4081 ATGCTGATGCTGCTGGCCCTGGGACTGCACTGCATGCATGTGAAGCCCTATAGGCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGA
4161 ATGTGTGGCTCTGGCTGCCAGGGCCCAACTCGGTTTCACACGGATCGTGCTGCTCCCTGGCCAGCCCTTTGGCCACAGCAC
4241 CACCAGCTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTCTGTGACATGTTGGCTTTTCATCAGCCACCCCTGGGAAGCGGAAAGTAGC
4321 TGCCACTATCTTTGTTTCCCCACCTCAGGCCCTCACACTTTCCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCC
4401 ATTCAGAGTTGTTCTCCCATCTCTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCATCACATCTTATCTTGATC
4481 TTTGCTCCCACTGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAAGCCCCACGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAAGGGCATTTGAAGC
4561 TCACTCCACCTGAACCATGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTCAAGGGCTTGGCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGCTGCCC
4641 CAACCTTTCAAGGAGGAAACCAGACACCTGAGACAGGAGCTGTATGCAAGCCAGTGCAAGCTTGCAGAGGACAAAGGCTG
4721 GAGGCATTTGTTCATCACTACAGATATGCAACTAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTTCCACCCGAGGCCGCTTTT
4801 TTAGGCCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTAAAGAAAAAAATCTGCTCACAGTCTGTT
4881 CTGGAGGTCAATCACCAACAAAGCTCAAGCCCTATGCAGTTCTGAGAAGGTGGAGGCCACAGGCTCAAAAGAGGAAAT
4961 TAGAATTTCTCATTTGGGAGAGTAAGGTACCCCATCCAGAAATGATAACTGCACAGTGGCAGAACTCCACCCCTAAT
5041 GTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCCCTGAATGTAAACAAAAGGGCTTATTCTTCTCAAGTAAGGGGGAACCTCT
5121 GCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTCTGCTTTTCAGACGCAAACTGAAAAATGGCTCTTCTTGGGTCTTGAGCTTGCTGGC
5201 ATATGGAAGTGAAGAACTATGCTATTGGATCTCCTGGATCTCCAGCTTGCTGACTGCAGATCTTGAGATATGTCAGCCT
5281 CTACAGTCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATCTTTC

```

FIGURA 18C - 1

```

1 AGTGAAGGGGTTTCCCATATGAAAAATACAGAAAGAAATTATTTGAATACTA
52 GCAAAATACACAACCTTGATATTTCTAGAGAAACCCAGGCACAGCTTTGGAGAC
103 ATTACTCCTGAGAGACTGCAGCTGATGGAGAGATGAGCCCCAACTTCTAAAA
154 ATGTATCACTACCGGGATTGAGATACAAACAGCATTAGGAAGGTCTCATC
205 TGAGTAGCAGCTTCCTGCCCTCTCTCTGGAGATAAGTCGGGCTTTTGGTG
256 AGACAGACTTTCCCAACCCCTCTGCCCGGCGGTGCCCATGCTTCTGTGGCT
1 M L L W L
307 GCTGCTGCTGATCCTGACTCCTGGAAGAGAACAAATCAGGGGTGGCCCCAAA
6 L L L I L T P G R E Q S G V A F K
358 AGCTGTACTTCTCCTCAATCCTCCATGGTCCACAGCCTTCAAGGAGAAAA
23 A V L L L N P P W S T A F K G E K
409 AGTGGCTCTCATATGCAGCAGCATATCACATTCCTTAGCCCAAGGAGACAC
40 V A L I C S S I S H S L A Q G D T
460 ATATTGGTATCACGATGAGAAGTTGTTGAAATATAACATGACAAGATCCA
57 Y W Y H D E K L L K I K H D K I Q
511 AATTACAGAGCCTGGAATTAACCAATGTAAGACCCGAGGATCCTCCCTCAG
74 I T E P G N Y Q C K T R G S S L S
562 TGATGCCGTGCATGTGGAATTTTCACTGACTGGCTGATCCTGCAGGCTTT
91 D A V H V E F S E D W L I L Q A L
613 ACATCCTGTCTTTGAAGGAGACAATGTCATTCGAGATGTCAGGGGAAAGA
108 H P V F E G D N V I L R C Q C K D
664 CACAAAAACACTCCTCAAAAGGTTTACTACAAGGATGGAACACAGCTTCC
125 N K N T H Q K V Y Y K D G K Q L P
715 TANTAGTTATAATTTAGAGAGATCACAGTGAATTCAGTCTCCAGGGATAA
142 N S Y N L E K I T V N S V S R D N
766 TAGCAAAATATCATTGTAAGCTTATAGGAAGTTTACATACTTGACATTTGA
159 S K Y H C T A Y R K F Y I L D I E
817 AGTAACCTTCAAAACCCCTAAATATCCAAAGTCAAGAGCTGTTTCTACATCC
176 V T S K P L N I Q V Q E L F L H P
868 TGTGCTGAGAGCCAGCTCTTCCACGCCCATAGAGGGGAGTCCCATGACCT
193 V L R A S S S T P I E G S P M T L
919 GACCTGTGAGAGCCAGCTCTTCCACAGAGCCAGATGTCCAGCTGCAAT
210 T C E T Q L S P Q R F D V Q L O F
970 CTCCTCTTTCAGAGATAGCCAGACCCCTCGGATTTGGGCTGGAGCAGGTCCCC
227 S L F R D S Q T L G L G W S R S P
1021 CAGACTCCAGATCCCTGCCATGTGGACTGAAGACTCAGGGTCTTACTGGTG
244 R L Q I P A M W T E D S G S Y W C
1072 TGAGGTGGAGACAGTCACTCACAGCATCAAAAAAGGAGCCTGAGATCTCA
261 E V E T V T H S I K K R S L R S Q
1123 GATACCTGTACAGAGAGTCCCTGTGTCTAATGTGAATCTAGAGATCCGGCC
278 I R V Q R V P V S N V N L E I R P
1174 CACCGGAGGGCAGCTGATTGAAGGAGAAAAATAGTCTCTTATTGTGCTAGT
295 T G G Q L I E G S N M V L I C S V
1225 AGCCAGGGITCAGGACTGTACATTTCTCCTGGCACAAGAGAGGAGAGT
312 A Q G S G T V T F S W H K E G R V
1276 AAGAAGCCTCGGTAGAAGAGCCAGCGTTCCCTGTGTGGCAGAGCTGCATGT
329 R S L G R K T Q R S L L A E L H V
1327 TCTCACCTCAAGGAGAGTGTATCCAGGAGATACTACTGTGCAGCTGATAA
346 L T V K E S D A G R Y Y C A A D N
1378 CGTTCACAGCCCCATCTCAGCAGCTGGATTTCGAGTCAACCTGAGAAATTC
363 V H S P I L S T W I R V T V R I P
1429 CGTATCTACCCCTGTCTCAGCTTCAGGCTCCAGGGGCCACACTGTGCT
380 V S H F V L T F R A P R A H T V V
1480 GGGGACCTGTGTGGAGCTTCACTGTGAGTCCCTGAGAGGCTCTCCCCGAT
397 G D L L E L H C E S L R C S P P I
1531 CCTGTACCGATTATATCATGAGGATGTACCCCTGGGGAAACAGCTCAGCCCC
414 L Y R F Y H E D V T L G N S E A F
1582 CTCTGGAGGAGAGGCTCTCTCAACCTCTCTCTGACTSCAGAACATTCTGG
431 S G G G A S F N L S L T A E H S G
1633 AAATCTCTCTGTGATGCAGACATGGCCCTGGGGGCCAGCACTCATGG
448 N Y S C D A D N G L G A Q H S H G
1684 AGTGAGTCTCAGGGTCACAGTTCCGGTGTCTCGCCCCCTCCTCACCTCAG
465 V S L R V T V P V S R P V L T L R
1735 GGCTCCCGGGGCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGA
483 A P G A Q A V V G D L L E L H C E
1786 GTCCCTGAGAGGCTCTTCCCGATCCTGTACTGTTTATCAGGAGGATGA
499 S L R G S P P I L Y W F Y H E D D
1837 CACCTTGGGGACATCTTCGGCCCACTCTGGAGGAGGGGATCTTCAACCT
516 T L G N I S A H S G G G A S F N L
1888 CTCTCTGACTACAGAACATCTCTGGAACACTCTCTGTGAGGCTGACAAATGG
533 S L T T E H S G N Y S C E A D N G

```

62

FIGURA 18D - 1

```

1  TGGTGACCAAGAGTACATCTCTTTTCAAATAGCTGGATTAGGTCTCATGC
1      M L
52  TGCTGTGGTCATTGCTGGTCATCTTTGATGCAGTCACTGAACAGGCAGATT
19  L W S L L V I F D A V T E Q A D S
103 CGCTGACCCCTTGTGGGCCCCCTCTTCTGTCTTGAAGGAGACAGCATCGTTC
36  L T L V A P S S V F E G D S I V L
154 TGAATGCCAGGGGAGAACAGAAGTGAAGAAATTCAGAAGATGGCTTACCATA
53  K C Q G E Q N W K I Q K M A Y H K
205 AGGATAACAAAGAGTTATCTGTCTTCAAAAAATTCAGATTTCCTTATCC
70  D N K E L S V F K K F S D F L I Q
256 AAAGTGACGTTTAAAGTGACAGTGGTAACATTTCTGTAGTACCAAGGAC
87  S A V L S D S G N Y F C S T K G Q
307 AACTCTTTCTCTGGGATAAACTTCAAATATAGTAAAGATAAAAGTCCCAAG
104  L F L W D K T S N I V K I K V Q E
358 AGCTCTTTCAACGTCCTGTGCTGACTGCCAGCTCCTTCCAGCCCCATCGAAG
121  L F Q R P V L T A S S F Q P I E G
409 GGGGTCCAGTGAGCCTGAAATGTGAGACCCGGCTCTCTCCACAGAGGTTGG
138  G F V S L K C E T R L S P Q R L D
460 ATGTCAACTCCAGTTCTGCTTCTTCAGAGAAACAGGTCCTGGGGTCAG
155  V Q L Q F C F F R E N Q V L G S G
511 GCTGGAGCAGCTCTCCGAGCTCCAGATTCTGCCGTGTGGAGTGAAGACA
172  W S S S P E L Q I S A V W S E D T
562 CAGGCTCTTACTGGTGCAAGGCAGAAACGGTGACTCACAGGATCAGAAAC
189  G S Y W C K A E T V T H R I R K Q
613 AGAGCCTCCAATCCAGATTTCAGTGCAGAGAATCCCCATCTCTAATGTAA
206  S L Q S Q I H V Q R I P I S N V S
664 GCTTGAGATCCGGGCCCCCGGGGGACAGGTGACTGAAGGACAAAACTGA
223  L E I R A P G G Q V T E G Q K L I
715 TCCTGCTCTGCTCAGTGGCTGGGGGTACAGGAAATGTACATTCTCCTGGT
240  L L C S V A G G T G N V T F S W Y
766 ACAGAGAGGCCACAGGAACAGTATGGGAAAGAAAACCCAGCGTTCCTGT
257  R E A T G T S H G K K T Q R S L S
817 CAGCAGAGCTGGAGATCCAGCTGTGAAAGAGAGTATGCCGGCAAAATAT
274  A E L E I P A V K E S D A G K Y Y
868 ACTGTAGAGCTGACAACGGCCATGTGCCTATCCAGAGCAAGGTGGTGAATA
291  C R A D N G H V P I Q S K V V N I
919 TCCCTGTGAGAATTCAGTGTCTCGCCCTGTCTCACCCCTCAGGTCTCCTG
308  P V R I P V S R P V L T L R S P G
970 GGGCCAGGCTGCAGTGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGA
325  A Q A A V G D L L E L H C E A L R
1021 GAGGCTCTCCCCCAATCTTGTACCAATTTTATCATGAGGATGTCAACCTTG
342  G S P P I L Y Q F Y H E D V T L G
1072 GGAACAGCTCGGCCCCCTCTGGAGGAGGGCCCTCCTTCAACCTCTCTTTGA
359  N S S A P S G G G A S F N L S L T
1123 CTGCAGAACATTCTGGAACTACTCCTGTGAGGCCAACACGGCCTGGGGG
376  A E H S G N Y S C E A N N G L G A
1174 CCCAGTGCAGTGAGGCACTGCTCCTATCTCAGGACCTGATGGCTATA
393  Q C S E A V P V S I S G P D G Y R
1225 GAAGAGACCTCATGACAGCTGAGTTCTCTGGGGACTGTTTGTGTCTCTG
410  R D L M T A G V L W G L F G V L G
1276 GTTTCAGTGGTGTCTCTTGTGTGTATGCTTGTTCACAAAGATATCAG
427  F T G V A L L L Y A L F H K I S G
1327 GAGAAAGTTCTGCCACTAATGAACCCAGAGGGGCTTCCAGGCCAAATCCTC
444  E S S A T N E P R G A S R P N P Q
1378 AAGAGTTACCTATTCAAGCCCAACCCAGACATGGAGGAGCTGCAGCCAG
461  E F T Y S S P T P D M E E L Q P V
1429 TGTATGTCAATGTGGGCTCTGTAGATGTGGATGTGGTTTATTCTCAGGTCT
478  Y V N V G S V D V D V V Y S Q V H
1480 GGAGCATGCAGCAGCCAGAAAGCTCAGCAAAACATCAGGACACTTCTGGAGA
495  S N Q Q P E S S A N I R T L L E N
1531 ACAAGGACTCCCAAGTCATCTACTCTTCTGTGAAGAAATCATAACACTTGG
512  K D S Q V I Y S S V K K S
1582 AGGAATCAGAAAGGAGATCAACAGCAAGATGGGGCATCATTAAAGACTTG
1633 CTATAAAACCTTATGAAAATGCTTGAGGCTTATCACTGCCACAGCCAGAA
1684 CGTGCCCTCAGGAGGCACCTCCTGTCTATTTTGTCTCTGATGATGTTCTCT
1735 CCAATATCTTCTTTTACCTATCAATATTCATTGAAGTGTGCTACATCCAG
1786 ACACCTGTGCAATAAATTTATTTCTGCTACCTTCTCTTAAGCAATCAGTGTG
1837 TAAAGATTTGAGGGGAAGAAATGAATAAGAGATACAAGGTCTCACCTTCATCT
1888 ACTGTGAAGTGTGAGAACAGGACTTGATAGTGGTGTATTAACTTATTTAT
1939 GTGCTGCTGGATACAGTTTGCTAATATTTTGTGAGAAATTTTTCAAATAT

```

FIGURA 18D - 2

```

1990 GTTCATTGGGAATATTGGCCTGAAATTTCTTTTCCACTGTGTCTCTGCCA
2041 GAATGTTTGTATCAGGCTGATGCTGGCTTCATAGAATGAGTTAGGCAGGAG
2092 CCCTTCCTCCTTGATTTTTTGGCATAGTTTCAGCAGGATTGGTACCACTTA
2143 TTCTTTCTGCATCTTGTAAGAATTCAGCTATGAATCCATCTGGTCTAGGGCT
2194 TTTGTGTTGGTTGGTAAGTTTTTTATTACTAATTCAACTTCAGCGCTTGAT
2245 ATTGCTCTAGGAGGGGTTTCTGTCTCTTCTGCTTCAATCTTGGGAGATTG
2296 TGTGTTTCCAGGAATTTAGCCGTTTCCCTCCAGATTTTCTTCTTTATGTGCA
2347 TCGACTTGAGTGTAACATAACTTATATGCACTGGGAAACCAAAAATCTG
2398 TGTGACTTGCTTTATTGCGAGCATTTGTTTTATTTTGGTAGTCTGGAACCTGA
2449 ACCTGCAATATCACCAAAGTATGCATATAGTTGCAAAAATGTGATTTTTGA
2500 CATAGTAAATATGAGTATTTGCAATAAACTATGATATTACTTTTGTAAGTA
2551 TATAGAATAAAAATGTAAATAATCTATAAAA

```


FIGURA 18E - 1

```

1          GAGGCATCTCTAGGTACCATCCCTGACCTGGTCCCTC
37 ATGCTGCCGAGGCTGTGCTGTGATCTGTGCTCCACTCTGTGAA
   M L P R L L L L I C A P L C E
82 CTTGCCGAGCTGTGTTTTGATAGCCAGCCCCCTCCCATCCACAGAG
   P A E L F L I A S P S H P T E
127 GGGAGCCCAAGTGACCTGACGTGTAAGATGCCCCCTTCTACAGAST
   G S P V T L T C K M P F L Q S
172 TCAGATGCCAGTTCAGTTCGTCTTTTCAGAGACACCCGGGCC
   S D A Q P Q F C F F R D T R A
217 TTGGGCCCAAGGCTGGAGCAGCTCCCCCAAGCTCCAGATCGCTGCC
   L G P G W S S S P K L Q I A A
262 ATGTGGAAGAAGACACAGGGTCATACTGGTGGAGGCACAGACA
   M W K E D T G S Y W C E A Q T
307 ATGGCGTCCAAAGTCTTGAGGAGCAGGAGATCCAGATAAATGTG
   M A S K V L R S R R S Q I N V
352 CACAGGGTCCCTGTCGCTGATGTGAGCTTGGAGACTCAGCCCCCA
   H R V F V A D V S L E T Q P P
397 GGAGGACAGGTGATGGAGGGGAGACAGGCTGGTCCCTCATCTGTCA
   G G Q V M E G D R L V L I C S
442 GTTGCTATGGGCACAGGAGACATCACTTCCTTTGGTACAAAGGG
   V A M S T G D I T F L W Y K S
487 GCTGTAGGTTTAAACCTTCAGTCAAAGACCCAGGCTTCACTGACA
   A V G L N L Q S K T Q R S L T
532 GCAGAGTATGAGATTCCCTTCAGTGAGGGAGAGTATGCTGAGCAA
   A E Y E I P S V R E S D A E Q
577 TATTACTGTGTAGCTGAJAAATGGCTATGGTCCGAGCCCCAGTGGG
   Y Y C V A E N G Y G P S P S G
622 CTGGTGAGCATCACTGTGAGAAATCCCGGTGTCTCGGCCAATCCCTC
   L V S I T V R I P V S R P I L
667 ATGCTCAGGGCTCCGAGGGCCAGGCTGCAGTGGAGGATGTGCTG
   M L R A P R A Q A A V E D V L
712 GAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCTCTCCCAATCCCTGTAC
   E L H C E A L R G S P P I L Y
757 TGGTTTTATCACAGGATATCACTCCGGGAGCAGGTCCGCCCCC
   W F Y H E D I T L G S R S A P
802 TCTGGAGGAGGAGGCTCCTTCAACCTTTCCCTGACTGAAGAACAT
   S G G G A S F N L S L T E E K
847 TCTGGAAACTACTCTGTGAGGCCAACAATGGCTGGGGGCCAG
   S G N Y S C E A N N G L G A Q
892 CCACTGAGGGCGGTGACACTCAACTTCACTGCTTACTGGGGCC
   R S E A V T L N F T V P T G A
937 AGAAGCAATCATCTTACCTCAGGAGTCATTGAGGGGCTGCTCAGC
   R S N H L T S G V I E G L L S
982 ACCCTTGGTCCAGCCACCGTGGCCTTATTATTTTGTCTACGGCCTC
   T L G P A T V A L L F C Y G L
1027 AAAGAGAAATAGGAAGACCTTCAGCCAGGGATCCACTCAGGAGC
   K R K I G R R S A R D P L R S
1072 CTTCGAGCCCTCTAOCOCAGAGTTCACTTACCTCAACTCACT
   L P S F L P Q E F T Y L N S P
1117 ACCCCAGGGCAGCTACAGCCTATATATGAJAATGTGAATGTGTA
   T P G Q L Q P I Y E N V N V V
1162 AGTGGGGATGAGGTTTATTCACTGGCGTACTATAACCCAGCCGGAG
   S G D E V Y S L A Y Y N Q P E
1207 CAGGAATCAGTAGCAGCAGAAACCTGGGGACACATATGAGGAGC
   Q E S V A A E T L G T H M E D
1252 AAGGTTTCTTAGACATCTATTCCAGGCTGAGGAAGCAACATT
   K V S L D I Y S R L R K A N I
1297 ACAGATGTGGACTATGAAGATGCTATGTAA 1326
   T D V D Y E D A M *
          GGTT ATGGAAGATT CTGCTCTTTG
1351 AAAACCATCC ATGACCCCAA GCCTCAGGCC TGATATGTTT TFCAGAGATC
1401 CTGGGGCATT AGCTTTCCAG TATACCTCTT CTGGATGCCA TTCTCCATGG
1451 CACTATTCTT TCATCTACTG TGAAGTGAAG TTGGCGCAGC CCTGAAGAAA
1501 CTACCTAGCA GAACTAATAG ACACAGGAGT GACAGGGACT TTGTTATCAG
1551 AACAGATTTC CTGGGGGCTC CTTTGAAAAC AGGTTCATATT GTGCTCTTCT
1601 GTTTACAAGA GCAACACAAG TGGAAATAAA GAAATGGGA TCTTGGGTTG
1651 GAGGGACAGT GAAGCTTAGA GCACATGAAC TCAAGGTTAG TGACTCTGCA
1701 GGACTTCACA GAGAGAGCTG TGCCCATCAT TCAGTCCAG TGCTTTCTCT
1751 GCCCAGACAG CACAGAACTC CAGCCCCGCT ACTTACATGG ATCATGAGT
1801 TTCCACCTAA AATATGATTG TATTTATTTT GAGTCACTGT TACCAAAATA

```

FIGURA 18E - 2

```

1851  GAACTAAAAC  AAAGTTACAT  AAAAAGTTAT  TGTGACTCCA  CTTAATTTTA
1901  GTGACGTATT  TTTGTATATA  TAGGCCAACC  TATACCACAT  CCAAAATTAT
1951  GTATCTATTA  CAGCCCTAG  AAGCTTTATA  AATACAGTGT  GTCTTCTTTT
2001  ATTCACAAAA  TTTTGGAAAT  CGTGGTAATA  TGGTTGAAA  CCTGTATCTT
2051  AATTATTTTT  TTTTAAATT  GAGACAGGCT  CTCACTCTGT  CACTCAATCT
2101  GGAATGCAGT  GGCACAATCT  TGCTCACTG  CAACGCGTGC  CTCTCAGGCT
2151  CAAGCAAACC  TCTCAGCTCA  GCCTGCTGAG  TAGCTGGGAC  TACAGGCACA
2201  TGCCACCAAA  CTTGGCCATT  TTTTGTCTTA  CGTAGAGACA  AGATTTCAAC
2251  GTTTTGCCCA  GGCTGGTCTC  AAACCTCTGG  GCTCAAGCAA  TGTATTGAAT
2301  TTT

```