

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 428**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006** **E 14186905 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2913343**

54 Título: **Anticuerpo anti-ILT7**

30 Prioridad:

20.12.2005 JP 2005366465

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

11.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 699 428 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-ILT7

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo que se une al ILT7 humano.

Arte anterior

10

El interferón α (IFN α : de aquí en adelante, "interferón" se abrevia como IFN) e interferón β (IFN β) se conocen como IFN tipo 1 el cual posee actividad antiviral o actividad antitumoral. Por otra parte, se reveló también que el IFN α se relaciona con enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, se reportó la producción anormal de IFN α en pacientes con las siguientes enfermedades autoinmunitarias. También se sugirió que los síntomas de las enfermedades autoinmunitarias pueden reducirse por la neutralización del IFN α .

15

Lupus eritematoso sistémico (Shiozawa y otros, Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992)

Reumatismo crónico (Hopkins y otros, Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988)

20

Se reportaron casos en los que los síntomas de las enfermedades autoinmunitarias se han manifestado o empeorado por la administración de IFN α 2 o IFN recombinante (Wada y otros, Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995; Perez y otros, Am. J. Hematol. 49, 365, 1995; Wilson LE y otros, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002.).

25

Más aun, se reveló también que el IFN α induce la diferenciación de las células dendríticas. La célula dendrítica es además una célula presentadora de antígeno. Por lo tanto, se considera que la inducción de la diferenciación de las células dendríticas consiste de un mecanismo importante en las enfermedades autoinmunitarias. Se sugirió que existe una profunda asociación entre la inducción de la diferenciación de las células dendríticas del IFN α y la aparición del lupus eritematoso sistémico (Blanco y otros, Science, 16:294, 1540-1543, 2001). Así, se ha señalado que el IFN α está estrechamente relacionado con la actividad antitumoral así como con enfermedades autoinmunitarias. Adicionalmente, el IFN α está profundamente involucrado en la aparición de la soriasis (Nestle FO y otros, J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005).

30

Las células productoras de interferón (IPC) se identificaron como las células que producen IFN tipo 1 en grandes cantidades asociado con la infección viral. Pocas IPC se presentan en la sangre. Se considera que los linfocitos de sangre periférica justifican el 1% o menos de las IPC. Sin embargo,

35

Las IPC tienen una capacidad muy alta para producir IFN. La capacidad de las IPC para producir IFN alcanza, por ejemplo, 3000 pg/ml/10⁴ células. O sea, se puede decir que la mayor parte del IFN α o IFN β en la sangre, que se produce en la infección viral, es el resultado de las IPC, aunque haya pocas células.

40

Por otra parte, las IPC son células dendríticas linfoides no diferenciadas que se consideran como células precursoras de células dendríticas. Las IPC pueden referirse como células dendríticas plasmocitoides. Las IPC se diferencian en células dendríticas por la estimulación del virus e inducen la producción de IFN γ o IL-10 por las células T. Las IPC se diferencian además en células dendríticas por la estimulación de IL-3. Las células dendríticas diferenciadas por estimulación de IL-3 inducen la producción de la citocina Th2 (IL-4, IL-5, y IL-10) por las células T. Así, las IPC tienen propiedades que les permite diferenciarse en distintas células dendríticas por diferente estimulación.

45

En consecuencia, las IPC tienen dos perfiles: células que producen IFN y células precursoras de células dendríticas. Ambas células desempeñan una importante función en el sistema inmune. En otras palabras, la IPC es una de las células importantes que soportan el sistema inmune en varios aspectos.

50

Documento no patente 1: Shiozawa y otros, Arthr. & Rheum. 35, 412, 1992

Documento no patente 2: Hopkins y otros, Clin. Exp. Immunol. 73, 88, 1988

55

Documento no patente 3: Wada y otros, Am. J. Gastroenterol. 90, 136, 1995

Documento no patente 4: Perez y otros, Am. J. Hematol. 49, 365, 1995

60

Documento no patente 5: Bianco y otros, Science, 16:294, 1540-1543, 2001

Documento no patente 6: Ju y otros, Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.

Documento no patente 7: Colonna M y otros, Seminars in Immunology 12: 121-127, 2000.

Documento no patente 8: Nakajima H. y otros, J. Immunology 162: 5-8. 1999

Documento no patente 9: Wilson LE y otros, Semin Arthritis. Rheum. 32, 163-173, 2002

Documento no patente 10: Nestle FO y otros, J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005

Documento de patente 1: WO03/12061 (Solicitud de patente de Estados Unidos publicada núm. 2003-148316)

Descripción de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que se une a un ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano y suprime la producción de interferón- α (IFN α) a partir de células que expresan el ILT7 o un fragmento que comprende su región de unión a antígeno, para su uso en terapia.

[Medios para resolver los problemas]

Para regular la actividad de un factor humoral tal como IFN, es eficaz a administración de anticuerpos que reconocen el factor. Por ejemplo, se han realizado intentos de tratar enfermedades autoinmunitarias por anticuerpos contra la interleucina (IL)-1 o IL-4 (Guler y otros, Arthritis Rheum., 44. S307, 2001). Además, se asumió que los anticuerpos neutralizantes pueden servir como agentes terapéuticos de enfermedades autoinmunitarias como con el interferón (Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003). Puede predecirse que el mismo enfoque que el descrito anteriormente es eficaz en el IFN producido por las IPC. Sin embargo, tal enfoque se basa en la inhibición del efecto del factor humoral después de la producción del factor. Si la producción del factor humoral deseado puede ser directamente controlado, pueden alcanzarse sustancialmente más efectos terapéuticos. Los anticuerpos, que reconocen la IPC humana, han sido reportados. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-BDCA-2 es el anticuerpo monoclonal IPC-específico humano (Dzionek A. y otros J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000). Se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-BDCA-2 es eficaz para inhibir la producción de IFN por las IPC humanas (J. Exp. Med. 194: 1823-1834, 2001.). Adicionalmente, se reportó además que los anticuerpos monoclonales, que reconocen las células productoras de interferón en ratones, inhiben la producción de interferón (Blood 2004 junio 1; 103/11: 4201-4206. Epub Diciembre 2003). Se reportó que el número reducido de células dendríticas se debió a los anticuerpos monoclonales contra las células dendríticas plasmocitoides en ratones (J. Immunol. 2003, 171: 6466-6477).

Igualmente, si se proporcionan los anticuerpos que reconocen las IPC humanas y pueden regular la actividad, sería útil. Por ejemplo, los presentes inventores ya habían demostrado que un anticuerpo, que reconoce Ly49Q, se une específicamente a las IPC de ratón. Sin embargo, el anticuerpo contra Ly49Q no interfirió con la actividad de las IPC del ratón (Blood, 1 abril 2005, Vol. 105, núm. 7, y págs. 2787-2792.; WO2004/13325). Por otra parte, ILT7 se conoce como una molécula cuya expresión específica es vista en células dendríticas plasmocitoides (Ju XS y otros y Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.; WO03/12061). Sin embargo, se obtuvo ninguno de los anticuerpos contra el ILT7. Por lo tanto, los efectos de los anticuerpos en las IPC son también desconocidos.

El ILT7 es una proteína de la membrana que contiene un motivo similar a la inmunoglobulina. Se reportó como una de las moléculas expresadas en las células del sistema mieloide o el sistema linfático (Colonna M y otros, Seminars in Immunology 12:121-127, 2000.). Una pluralidad de moléculas con estructuras análogas al ILT7 se refiere como la familia ILT. La familia ILT es además estructuralmente similar a los receptores inhibidores de las células asesinas (KIR). ILT7 presenta cuatro dominios tipo C similares a la inmunoglobulina al igual que otras moléculas de la familia ILT. Se consideró que ILT7 envía las señales de activación dentro de la célula al igual que ILT1, proteína tipo ILT1, ILT8, y LIR6a. Se confirmó que una molécula que pertenece a la familia de la ILT se expresa en células del sistema del hemocito (Young y otros, Immunogenetics 53: 270-278, 2001; "The KIR Gene Cluster. "Carrington, Mary y Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (Estados Unidos), NCBI; 2003).

Después, se detectó una alta expresión de ILT7 en las células dendríticas plasmocitoides (PDC) y una expresión inferior de ILT7 se detectó en las células dendríticas derivadas de monocito (MDDC) por hibridación sustractiva. ILT2 e ILT3 se expresaron no solamente en PDC sino también en DC obtenidas de células positivas para MDDC o CD34. Sin embargo, como el ARNm en ILT7 se expresó específicamente en PDC, se encontró que el ARNm pudiera servir como un marcador de

PDC. Además, se encontró que en ese momento, la expresión de ILT7 se redujo por estimulación de CpG (Ju XS y otros Gene. 28 de abril de 2004; 331: 159-64.; WO03/12061).

Los presentes inventores confirmaron que se facilitó la expresión específica de ILT7 en IPC a través del estudio en la IPC humana. Entonces, los presentes inventores intentaron producir anticuerpos de ILT7 y elucidar los efectos. Por ejemplo, las moléculas que constituyen las familias ILT tales como ILT2 e ILT3 tienen alta conservación, particularmente en secuencias de aminoácido de dominios extracelulares (La Figura 9). Estas familias ILT exhiben perfiles de expresión característicos en varias células sanguíneas, respectivamente. Por lo tanto, es un tema muy importante obtener un anticuerpo que pueda distinguirse inmunológicamente entre otras moléculas de la familia ILT e ILT7. Sin embargo, de hecho, fue difícil producir un anticuerpo que se una específicamente a las IPC humanas usando ILT7 como un inmunógeno debido a los obstáculos descritos más abajo.

Generalmente, una proteína producida por tecnología de recombinación de genes se usa como inmunógeno para obtener un anticuerpo que reconoce una cantidad traza de proteínas derivadas de los organismos vivos. Los presentes inventores trataron de expresar el ILT7 humano sobre la base de la información de una secuencia base de ADNc de ILT7 humano, la cual ya se había encontrado, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia base (Acceso al Banco de Genes Núm. NM_012276). Sin embargo, los presentes inventores no pudieron producir el ILT7 humano como un recombinante bajo condiciones normales. La secuencia parcial de aminoácidos de la proteína natural frecuentemente trata de usarse como un inmunógeno para obtener un anticuerpo de la proteína. Sin embargo, existen pocas secuencias de aminoácidos específicas al ILT7 humano en proteínas ya que la homología a las secuencias de aminoácidos es extremadamente alta en la familia ILT. Adicionalmente, es necesario seleccionar la región formada por la porción que se reconoce por los anticuerpos como un epítipo en la superficie de las células con el objetivo de permitir a los anticuerpos reconocer las moléculas en la superficie de las células. Por lo tanto, se ha considerado que la formación de un anticuerpo que es específico a ILT7 usando un fragmento de la secuencia de aminoácidos como inmunógeno no es realista.

Los presentes inventores mostraron que un anticuerpo, que se une a las IPC, puede obtenerse usando un inmunógeno especial bajo tales condiciones. Además, los presentes inventores encontraron que el anticuerpo así obtenido reconoció específicamente las IPC humanas y además tuvo un efecto de regulación de la actividad y así un éxito en completar la presente invención. Esto es, la presente invención se relaciona con el uso del siguiente anticuerpo anti-ILT7..

[Efectos de la invención]

Los presentes inventores han proporcionado un inmunógeno útil para producir un anticuerpo que reconoce el ILT7 humano y un método de producción del anticuerpo ILT7 anti-humano usando el inmunógeno. El ILT7 es una proteína de la membrana que pertenece a la familia de ILT. Particularmente, la secuencia de aminoácidos de la región extracelular está altamente conservada entre las familias del ILT. Por lo tanto, es extremadamente difícil producir un anticuerpo que se distinga entre las familias de ILT por los métodos generales de inmunización. Los presentes inventores mostraron que el anticuerpo, que reconoce el ILT7 humano, pueden obtenerse fácilmente usando células animales en las cuales ILT7 se coexpresa con la proteína de la membrana celular. El anticuerpo anti-ILT7, que puede obtenerse por los métodos divulgados en la presente, tiene una alta especificidad que distingue las células que expresan otras familias del ILT de aquellas que expresan las IPC humanas.

El anticuerpo anti-ILT7 humano divulgado en la presente se une a las IPC humanas. Adicionalmente, el anticuerpo divulgado en la presente reconoce específicamente las IPC humanas. Por lo tanto, es útil para detectar y aislar las IPC. IPC es una célula que produce la mayoría del interferón tipo 1. Por lo tanto, la detección y aislamiento son importantes en el diagnóstico y estudio de enfermedades que involucran IPC tales como las enfermedades autoinmunitarias. Particularmente, de acuerdo con los hallazgos de los presentes inventores, la expresión de ILT7 en las IPC no se reduce bajo la presencia de IFN α . La expresión de IFN α es frecuentemente facilitada en pacientes con enfermedades autoinmunitarias. Esto significa que el anticuerpo anti-ILT7 divulgado en la presente puede usarse para la detección y aislamiento de las IPC como los pacientes con enfermedades autoinmunitarias en los cuales se facilita la expresión del IFN α .

El anticuerpo anti-ILT7 proporcionado por los métodos divulgados en la presente tiene un efecto que regula la actividad de las IPC humanas en una modalidad preferida. Por lo tanto, el/los anticuerpo(s) anti-ILT7 divulgado(s) en la presente puede usarse para inhibir la actividad de las IPC. Como se describió anteriormente, la expresión de ILT7 en las IPC no se reduce bajo la presencia de IFN α . Por lo tanto, si se usa la inhibición de la actividad de las IPC por el/los anticuerpo(s) divulgado(s) en la presente, se puede esperar un efecto terapéutico en los pacientes con enfermedades autoinmunitarias en las que se facilita la expresión de IFN α .

Escasas IPC producen una gran cantidad de IFN. Los anticuerpos como muchas moléculas de IFN son necesarios para la neutralización de IFN. Sin embargo, la producción de la activación celular se inhibe directamente en la presente invención. Como resultado, puede esperarse un fuerte efecto inhibitor sobre IFN, aún cuando se usan cantidades más pequeñas de

anticuerpos en comparación con la neutralización por anticuerpos anti-IFN. Además, en el caso donde continuamente se produce IFN, se predice que la neutralización por los anticuerpos contra IFN es una inhibición transitoria. En la presente invención, ya que se inhibe la actividad de las IPC, puede esperarse el efecto inhibitor de la producción de IFN durante un largo período de tiempo.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1a es una fotografía en la que se examina la expresión de ARNm del gen ILT7 por el método de RT-PCR. Es un resultado de la expresión del ARNm del gen ILT7 analizado en inmunocitos humanos.

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

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

La Figura 3 es un diagrama que muestra un resultado en el que se introdujeron el vector de expresión de ILT7 y vector de expresión de FcR γ en las células y se examinó por FCM la expresión en la superficie celular de las moléculas ILT7. El eje horizontal muestra la intensidad de fluorescencia detectada en el anticuerpo anti-FLAG, es decir, la intensidad de la expresión en la superficie celular de moléculas ILT7 a las que se adjuntó la etiqueta FLAG y el eje vertical muestra el número de células.

La Figura 4 muestra las fotografías en las que se introdujeron vector de expresión de ILT7 y el vector de expresión-FcR γ en las células y se analizó la asociación de las moléculas por inmunoprecipitación e inmuno-electrotransferencia. Los diagramas del lado izquierdo muestran los resultados que la molécula ILT7 se transfirió con anticuerpo anti-FLAG después de inmunoprecipitar la molécula FcR γ con el anticuerpo anti-myc (la figura de arriba) y la molécula FcR γ se transfirió con el anticuerpo anti-myc (la figura más abajo). Igualmente, los diagramas del lado derecho muestran los resultados que la molécula ILT7 se transfirió con el anticuerpo anti-FLAG después de inmunoprecipitar la molécula FcR γ con anticuerpo anti-FLAG (arriba) y la molécula FcR γ se transfirió con el anticuerpo anti-myc (más abajo).

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

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

La Figura 6b es un diagrama en el que se examinó la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos por análisis FCM. (b) muestra un resultado en el que se examinó la unión del anticuerpo anti-ILT7 a la molécula ILT7 usando las células 293T en las que se introdujeron los vectores de expresión de ILT7 y FcR γ . El eje vertical muestra la sensibilidad del anticuerpo anti-FLAG, a saber, la intensidad de la expresión de moléculas de ILT7 a la que se adjuntó la etiqueta FLAG y el eje horizontal muestra la sensibilidad de los anticuerpos anti-ILT7 respectivos.

La Figura 7 es un diagrama en el que se examinó la sensibilidad de dos clones a linfocitos humanos de sangre periférica por análisis FCM entre los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos. Los tres gráficos de la izquierda muestran los resultados de #11 y los tres gráficos en la derecha muestran los resultados de #17. En los diagramas del lado izquierdo, cada eje con la marca de ILT7 muestra la sensibilidad de ILT7#11. Igualmente, en los diagramas del lado derecho, cada eje con la marca de ILT7 muestra la sensibilidad de ILT7#17.

La Figura 8 es un resultado en el que la actividad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos ILT7#11 e ILT7#17 a los linfocitos humanos se comparó y examinó con la de los anticuerpos anti-BDCA-2 de anticuerpos. El eje vertical muestra la sensibilidad del anticuerpo anti-CD123 y el eje horizontal muestra la sensibilidad de cada anticuerpo. Esto

es, cada anticuerpo se une a una porción de células CD123 positivas. Es un diagrama que muestra los resultados en los que se analizó la sensibilidad cuando las células de linfocitos se estimularon por dos tipos de CpGs e IFN α .

La Figura 9a es un diagrama que muestra las secuencias de aminoácidos de la familia de moléculas con una alta homología a las moléculas ILT7. Cada secuencia de aminoácidos de la región extracelular se muestra principalmente como un alineamiento; la Figura 9b es una continuación de la Figura 9a, y la Figura 9c es una continuación de la Figura 9b.

La Figura 10 es un resultado en el que se examinó la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos ILT7#11 e ILT7#17 a las moléculas ILT1, ILT2 e ILT3 usando las células en las que se introdujeron sus vectores de expresión. El diagrama superior muestra los resultados donde se reafirmó la sensibilidad a las células en las que las moléculas ILT7 con una etiqueta FLAG se coexpresaron con FcR γ . El diagrama inferior muestra los resultados de la sensibilidad a las células en las que se introdujeron ILT1, ILT2, ILT3 y FcR γ (diagrama de la izquierda: ILT7#11, diagrama de la derecha: ILT7#17). El eje horizontal muestra la sensibilidad de cada anticuerpo anti-ILT7.

La Figura 11 es un diagrama que muestra el efecto de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos ILT7#11 e ILT7#17 sobre la capacidad interferogénica de los linfocitos humanos. En el diagrama, el eje horizontal muestra la concentración de IFN α en un sobrenadante de cultivo cuando los linfocitos humanos se estimularon con el virus de la influenza y el eje vertical muestra los anticuerpos tratados. El término "sin infecciones" indica los resultados de las células que no se estimularon con el virus de la influenza.

La Figura 12 es un diagrama que muestra la actividad CDC de los Anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos ILT7#37, ILT7#28, e ILT7#33. Aún cuando se usaron los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 obtenidos de cualquier hibridoma, se exhibió 80% o más de la actividad CDC en la concentración de anticuerpo de 0.1 μ g/ml o más. En el caso de los anticuerpos distintos al anticuerpo monoclonal anti-ILT7, no se observó actividad CDC de las células objetivo.

La Figura 13 es un diagrama que muestra la internalización a las células objetivo de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos ILT7#17, ILT7#26, ILT7#37, ILT7#28, e ILT7#33.

La intensidad de fluorescencia de la APC es un indicador de la cantidad del complejo inmune ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que se presentó en la superficie de las células antes de la incubación y se detecta independientemente de si el complejo inmune ILT7-anticuerpo ILT7 está presente en la superficie de la célula objetivo o se incorpora en la célula después de la incubación. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de FITC es un indicador de la cantidad del complejo inmune de ILT7-anticuerpo anti-ILT7 que permanece en la superficie de las células después de la incubación. Esto es, la intensidad de la fluorescencia de FITC se disminuye por la internalización.

Se reportó que el ILT7 humano (transcrito-7 similar a la inmunoglobulina) es una molécula que se expresa específicamente en células dendríticas plasmocitoides (Gene. 28 de abril 2004; 331:1 59-64.; WO03/12061). Alternativamente, se conoce además que el ILT7 humano puede usarse como un indicador predictivo para el pronóstico del linfoma (WO2005/24043). Sin embargo, no se ha establecido un método para producir un anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano.

El ILT7 humano consiste de 499 residuos de aminoácido como se muestra en la sec. con núm. de ident.: 2 y es una proteína transmembrana tipo 1 que comprende cuatro dominios similares a la inmunoglobulina en la estructura y una región transmembrana (445-466; de 429 a 450 en la sec. con núm. de ident.: 2). Entre los 444 residuos de aminoácido que incluyen N-terminal, 16 residuos de aminoácido (de -15 a -1, en la sec. con núm. de ident.: 2) son secuencias señal y 17 de los 444 residuos de aminoácido (de 1 a 428, en sec. con núm. de ident.: 2) constituyen un dominio extracelular. Por otra parte, la región C-terminal es un dominio intracelular. La mayor parte de las porciones del ILT7 humano son dominios extracelulares y 33 residuos de aminoácido constituyen un dominio intracelular (de 467 a 499; de 451 a 483, en la sec. con núm. de ident.:2). No se prevé que un motivo, que se involucra en la señalización, esté presente en un dominio intracelular. Una secuencia de aminoácidos de longitud completa del ILT7 humano se muestra en la sec. con núm. de ident.:2 y una secuencia base de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos se muestra en la sec. con núm. de ident.:1. En este documento, las regiones de codificación del péptido maduro (72)..(1520), que se muestran en la sec. con núm. de ident.:1, no incluyen los codones de terminación e iniciación. Esto es, las secuencias de codificación de la proteína que incluyen los codones de terminación e iniciación en la sec. con núm. de ident.:1 se encuentran de 24 a 1523.

Se considera que la señal de ligando se transmite a las células por la asociación del ILT7 humano con una molécula de transducción de señal. Por ejemplo, la mayoría de las cadenas- γ del receptor Fc están presentes en las células. Adicionalmente, el dominio intracelular contiene un motivo de activación inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) que se involucra en la señalización. ITAM es una porción de la secuencia de aminoácidos, que se observa comúnmente en moléculas adaptadoras que se asocian con los inmunorreceptores, tales como receptores de Fc. Un motivo tal como YxxL (sec. con núm. de ident.:76), que es un objetivo de la fosforilación de la tirosina, se incluye en ITAM y la señal se transmite por la fosforilación. Ejemplos conocidos de la molécula de transducción de señales, que incluye ITAM en un dominio

intracelular, incluyen CD3 ξ y DAP12 además de la cadena- γ del receptor Fc. Entre estas moléculas de transducción de señales, la molécula asociada con el ILT7 humano se prevé que sea la cadena- γ del receptor Fc. Actualmente, no se ha encontrado un ligando, que se una a un ILT7 humano.

5 Los presentes inventores mediante análisis de expresión de genes confirmaron que ILT7 se expresó específicamente en las IPC humanas. Los presentes inventores consideraron que sería útil en el estudio de las IPC si se puede obtener un anticuerpo capaz de distinguir inmunológicamente el ILT7 humano de otras moléculas. Sin embargo, muchas moléculas con estructuras similares existen en la familia ILT incluyendo ILT7. Las moléculas tales como ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, 10 o LIR-8 incluyen las secuencias de aminoácido altamente homólogas, particularmente en sus dominios extracelulares. Por lo tanto, los presentes inventores consideraron que era difícil obtener un anticuerpo capaz de distinguir entre estas moléculas usando como inmunógeno un péptido de dominio que comprende una secuencia parcial de aminoácidos que constituye un dominio extracelular. Después, los presentes inventores trataron de producir un anticuerpo contra el ILT7 humano utilizando las células que expresan el ILT7 humano como inmunógeno.

15 Sin embargo, el uso de vectores de expresión generales no causó la expresión de ADNc de ILT7 humano en las células animales. Se reportó que la molécula ILT1 tiene una estructura muy similar a ILT7 asociada con la cadena- γ del receptor de Fc. Esto es, cuando se usaron como células huésped las células en las que se expresó la cadena- γ del receptor Fc tal como células RBL (leucemia basófila de rata) y células P815 (mastocitoma de ratón), se observó la expresión de ILT1 en la superficie celular. Sin embargo, no se observó la expresión en la superficie celular si ILT1 se forzó a ser expresado en las 20 células 293 en las que la cadena- γ del receptor Fc no se expresó originalmente. Por otra parte, se mostró que la expresión de LT1 en la superficie celular se puede confirmar cuando ILT1 se coexpresó con la cadena- γ del receptor Fc (Nakajima H. y otros, J. Immunology 162:5-8. 1999). Sin embargo, no existe información sobre un inmunógeno para producir anticuerpos contra ILT7.

25 Por ejemplo, en el informe, las células RBL en las que se introduce el gen ILT1 se usan como inmunógenos para producir anticuerpos contra ILT1. Los presentes inventores trataron de producir anticuerpos contra ILT7 usando la combinación de células RBL con el gen ILT7 de la misma manera como se describió. Sin embargo, aún cuando ILT7 se forzó a ser expresado en las células RBL (P815), no se observó la expresión de ILT7 en la superficie celular, y por lo tanto no se puede usar como un inmunógeno.

30 Los presentes inventores llevaron a cabo investigaciones dedicadas a obtener el anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano. Como resultado, los presentes inventores encontraron que el anticuerpo deseado puede producirse mediante el uso de una célula específica transformada como un inmunógeno y completarse la presente invención. Esto es, lo que se divulga en la presente se relaciona con un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, y se relaciona con un fragmento que comprende su región de unión al antígeno.

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

40 - Confirmación basada en la sensibilidad a las células humanas:

De acuerdo con los descubrimientos de los presentes inventores, se observó la expresión específica del ILT7 humano en las IPC humanas. Originalmente, el ILT7 humano se aisló como un gen cuya expresión se observa en las células dendríticas plasmocitoides (Blood. 2002 100; 3295-3303, Gene. 28 de abril 2004; 331:159-64.). Adicionalmente, es conocido también 45 que puede usarse como un marcador de células dendríticas plasmocitoides (WO03/12061) Se asume que las células dendríticas plasmocitoides y las IPC son poblaciones de células principalmente idénticas o sus porciones grandes son comunes. Por lo tanto, no existe contradicción entre estos reportes y los descubrimientos de los presentes inventores.

50 Teniendo en cuenta tal perfil de expresión del ILT7 humano, primero, la actividad de unión de las IPC o células dendríticas plasmocitoides al menos a un cierto subconjunto es una de las características importantes del anticuerpo que se une a ILT humana en la presente invención. Los marcadores de la superficie celular específicos a las poblaciones de células respectivas se pueden usar para determinar si una cierta célula es IPC o células dendríticas plasmocitoide. Por ejemplo, la unión a las células deseadas se puede confirmar por la tinción doble con el anticuerpo que se une unos marcadores de 55 superficie celular y el anticuerpo cuya actividad de unión se debe chequear. Esto es, las IPC en la presente invención incluyen, por ejemplo, las células que expresan BDCA2.

- Confirmación basada en la sensibilidad de las células transformadas que expresan el gen ILT7 humano:

60 Los presentes inventores encontraron que se reconstruyó una característica inmunológica de ILT7 expresado en las IPC humanas cuando se llevó a cabo la expresión del gen ILT7 humano bajo una condición específica. Por lo tanto, la

sensibilidad al ILT7 humano puede confirmarse además basado en la sensibilidad de los anticuerpos a las células en las que se introduce artificialmente un gen que codifica ILT7. Es decir, la presente invención se relaciona con un anticuerpo monoclonal que incluye la secuencia de aminoácidos que constituye un dominio extracelular como el dominio extracelular y se une a una molécula coexpresada con la molécula de transducción de señal o se relaciona con un fragmento que comprende su región de unión al antígeno. En este documento, el dominio extracelular está formado por una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la posición 17 a 444 de la secuencia de aminoácidos N-terminal que se muestra en la sec. con núm. de ident.:2 (de 1 a 428 en la sec. con núm. de ident.:2).

Por ejemplo, la característica inmunológica de ILT7 expresado en las IPC humanos se mantiene en las células co-transfectadas con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica el ILT7 humano y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica la molécula de transducción de señales. Por lo tanto, una célula transformada, que coexpresa el ILT7 humano y la molécula de transducción de señales, es preferible para confirmar la afinidad de unión de anticuerpos al dominio extracelular del ILT7 humano en la presente invención. Se desea usar una célula, que como los controles no se transforma, cuando la sensibilidad de anticuerpos se confirma usando la célula transformada. Más aun, es importante confirmar también que la unión de anticuerpos no se detecta usando la misma célula huésped que expresa sólo la molécula de transducción de señal como control.

Como se divulga en la presente, una molécula, que induce la expresión del ILT7 humano en la superficie celular, puede usarse como la molécula de transducción de señales para la coexpresión. La molécula de transducción de señales puede definirse además como una molécula que puede impartir la característica inmunológica del ILT7 humano natural al menos al dominio extracelular de la molécula ILT7 en una célula que expresa ILT7. Como se usa en la presente, el término "característica inmunológica" del ILT7 humano natural significa el reconocimiento por un anticuerpo que se une a unas IPC humanas.

Específicamente, es preferible usar la cadena- γ del receptor Fc o DAP12 como una molécula de transducción de señales. En la presente divulgación, la cadena- γ del receptor Fc es particularmente preferible como molécula de transducción de señales. La cadena- γ del receptor Fc es una molécula que consiste en secuencias de aminoácidos que se muestran en la sec. con núm. de ident.:16. La molécula de transducción de señales puede ser un fragmento tan largo como el ILT7 humano que se coexpresa y se localiza en la superficie celular. Tan largo como el ILT7 humano que se coexpresa y se localiza en la superficie celular, la mutación o adición de la secuencia de aminoácidos se permiten en las secuencias de aminoácidos que se muestran en la sec. con núm. de ident.:16. Esto es, los métodos divulgados en la presente son para producir las células que producen un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, que comprende las siguientes etapas de:

(1) administrar una célula que expresa exógenamente una proteína que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano y una molécula que comprende las secuencias de aminoácido descritas en la sec. con núm. de ident.:16 para animales inmunes; y

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

Posteriormente, es preferible usar como anticuerpo que une al ILT7 humano en la presente invención, un anticuerpo en el que no se observa el cruzamiento con las poblaciones de células que son conocidas por expresar familias de ILT distintas a ILT7. Específicamente, es preferible usar como el anticuerpo que se une al ILT7 humano en la presente invención, un anticuerpo en el que no puede observarse la unión a las poblaciones celulares que son conocidas por expresar familias de ILT distintas a ILT7 bajo la misma condición que la condición en la que se confirmó la unión a las IPC. Como ya se describió, por ejemplo, ILT2 e ILT3 se expresan no sólo en PDC, sino también DC obtenidas de MDCC o células CD34 positivas (Gene. 28 de abril 2004; 331: 159-64.). Por otra parte, la expresión de ILT7 no puede detectarse debido a la diferenciación de las IPC en las células dendríticas. Por lo tanto, el anticuerpo no puede detectar la unión a las DC obtenidas de MDCC o células CD34 positivas bajo la condición en la que se puede confirmar la unión a las IPC se incluye en el anticuerpo que se une a un ILT 7 humano en la presente invención.

Los siguientes patrones de expresión referentes a otras moléculas de la familia ILT se reportaron ("The KIR Gene Cluster" Carrington, Mary y Norman, Paul. Bethesda (MD): National Library of Medicine (Estados Unidos), NCBI; 2003, Gene. 28 de abril 2004; 331: 159-64.). Por lo tanto, un anticuerpo que se une a las IPC humanas o las PDC y cuya unión a las siguientes células no puede confirmarse está incluido en un anticuerpo que tiene especificidad a ILT7:

ILT1; células de linaje mieloide (monocitos, DC derivadas de monocitos, macrófagos);

ILT2; PDCs, células B, células CD34 positivas, DC derivadas de células CD34 positivas, y DCs derivadas de monocitos;

ILT3; PDC y DC;

ILT5; monocitos, DC derivadas de células CD34 positivas, y DC derivadas de monocitos; y

ILT8; células de linaje de monocitos.

Esto es, el anticuerpo monoclonal, que se une al dominio extracelular del ILT7 humano para su uso en la presente invención preferentemente, incluye un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

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

b) la unión del anticuerpo monoclonal a una o más células seleccionadas del grupo que consiste de monocitos, macrófagos, células B, células CD34 positivas, y células dendríticas derivadas de estas células no se puede confirmar bajo la condición de unión, a las IPC humanas. Como el anticuerpo monoclonal de la presente invención, es preferible usar un anticuerpo en el que no se pueden confirmar la unión a monocitos, macrófagos, células B, células CD34 positivas, y células dendríticas derivadas de estas células bajo la condición de unión, a las IPC humanas.

Alternativamente, el anticuerpo monoclonal, que se une al dominio extracelular del ILT7 humano para su uso en la presente invención, preferentemente incluye un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

c) el anticuerpo monoclonal se une a la célula transformada que se co-transfecta con un vector de expresión que porta expresivamente el ADN que codifica el ILT7 humano y un vector de expresión que porta expresivamente el ADN que codifica la molécula de transducción de señales;

d) la unión a la célula huésped previo a la transformación no puede confirmarse bajo la condición de unión a las células co-transfectadas como descrito en c); o

el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal que tiene las siguientes características inmunológicas:

e) la unión a la célula huésped que sólo expresa la molécula de transducción de señales no puede confirmarse bajo la condición de unión a las células co-transfectadas como se describió en c).

En la presente divulgación, puede confirmarse el hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 no intersecta con la familia de otras moléculas de ILT usando células en las que se forzó a expresarse cada familia ILT. Esto es, para la expresión forzada, el ADNc que codifica cada familia de secuencias de aminoácidos de ILT se introduce en una célula huésped adecuada. El anticuerpo monoclonal anti-ILT7 cuyo cruzamiento se debe confirmar se hace contactar con la célula transformada obtenida. Después, puede confirmarse que si no se observa la unión del anticuerpo a la célula, que expresa las moléculas de la familia ILT distintas a ILT7, el anticuerpo es capaz de distinguir inmunológicamente entre ILT7 y otras moléculas de la familia ILT. Por ejemplo, en los ejemplos descritos más abajo, se confirma el hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 obtenido por los métodos divulgados en la presente invención no se intersecta con ILT1, ILT2, e ILT3. Por lo tanto, un ejemplo preferido del anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención es el anticuerpo monoclonal que une a ILT7 en el que no puede detectarse la unión a ILT1, ILT2, e ILT3 bajo la misma condición.

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

La unión de un anticuerpo monoclonal cuya actividad de unión se debe confirmar con varios tipos de células se puede confirmar basado en, por ejemplo, el principio de la citometría de flujo. Para confirmar la sensibilidad de los anticuerpos basado en el principio de la citometría de flujo, es ventajoso marcar los anticuerpos con molécula o grupo atómico que produce una señal detectable con antelación. Generalmente, los marcadores fluorescentes o luminiscentes se usan. El clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) se puede usar para analizar la unión de los anticuerpos marcados con fluorescencia a las células basado en el principio de la citometría de flujo. El uso de FACS permite confirmar de manera eficiente la unión de una pluralidad de anticuerpos a una pluralidad de células.

Específicamente, por ejemplo, el anticuerpo A el cual se encontró anteriormente que es capaz de identificar las IPC y el anticuerpo B cuyas características de unión a las IPC se deben analizar, se hacen reaccionar con poblaciones celulares que

comprenden las IPC al mismo tiempo. El anticuerpo A y anticuerpo B se marcaron con una señal de fluorescencia que se distingue mutuamente por estos anticuerpos con antelación. En el caso donde se detectan ambas señales de las mismas poblaciones de células, se puede confirmar la unión de los anticuerpos a las mismas poblaciones de células. En otras palabras, se encontró que los anticuerpos A como B tienen similares características de unión. En el caso donde se unen a poblaciones de células diferentes, está claro que ambos anticuerpos tienen características de unión distintas.

Un ejemplo preferido del anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención puede incluir un anticuerpo monoclonal que se produce por el hibridoma ILT7#11 o ILT7#17. El hibridoma ILT7#11 y el hibridoma ILT7#17 se depositaron en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Organismo internacional depositario de patentes bajo los números de acceso FERM BP-10704 y FERM BP-10705 el 21 de octubre de 2005.

El contenido del depositario especificado es como sigue:

(a) Denominación y domicilio de la entidad depositaria: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Dirección del Organismo internacional depositario de patentes: AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón (código zip 305-8566)

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

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

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

El anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención puede ser un fragmento que comprende su región de unión al antígeno. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo que comprende la región de unión al antígeno que se obtiene por digestión enzimática de IgG puede usarse como el anticuerpo en la presente invención. Específicamente, los fragmentos de anticuerpo tales como Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse por digestión con papaína o pepsina. Es bien conocido que estos fragmentos de anticuerpos se pueden usar como moléculas de anticuerpo que tienen afinidad por los anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos contruidos por recombinación genética pueden usarse también mientras que la actividad de unión al antígeno se mantiene satisfactoria. Los ejemplos de anticuerpos contruidos por recombinación genética incluyen los anticuerpos quiméricos, anticuerpos CDR-trasplantados, Fvs de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos poliespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Es de conocimiento común que estos anticuerpos se pueden administrar usando anticuerpos monoclonales o células productoras de anticuerpos que se las células que producen los anticuerpos.

El anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención se puede obtener usando una célula transformada específica como un inmunógeno. Esto es, lo divulgado en la presente es un método para producir las células que producen un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, que comprende las siguientes etapas de:

(1) administrar una célula que expresa una proteína exógena que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano y una molécula exógena que se asocia con el ILT7 humano para animales inmunes; y

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

Las células productoras de anticuerpos así obtenida o las células productoras de anticuerpos inmortalizados se cultivan y los anticuerpos monoclonales deseados pueden recuperarse a partir de los cultivos. Con referencia al método para inmortalizar las células productoras de anticuerpos, se conocen varios métodos.

En el método para producir el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención, los ejemplos idóneos de la molécula, que se asocia con el ILT7 humano para producir una célula transformada que se usa como un inmunógeno, incluye las proteínas de membrana celular. Entre ellas, una molécula de transducción de señales, que se localiza en las membranas celulares, se prefiere usar como una proteína de membrana celular. El término "molécula de transducción de señales" significa una molécula que se asocia con las proteínas y las células que tienen estructuras receptoras en el dominio extracelular y transmite la estimulación de unir ligandos a receptores en las células. Los ejemplos de la molécula de transducción de señales incluyen la cadena- γ del receptor Fc, DAP12, o similares. Por ejemplo, la cadena- γ del receptor Fc se prefiere usar como una proteína de membrana celular. Las secuencias de aminoácidos del DAP12 humano y cadena- γ del receptor Fc así como una secuencia base de ADNc, que codifica las secuencias, son públicamente conocidas. Una secuencia base de la cadena- γ del receptor Fc humano y una secuencia de aminoácidos que se codifica por la secuencia base se muestran en las sec. con núms. de ident.:15 y 16, respectivamente.

Como se divulga en la presente, una célula transformada que se usa como un inmunógeno puede obtenerse preparando, por ejemplo, una célula que porta expresivamente los siguientes (a) y (b):

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

(b) un polinucleótido exógeno que codifica la cadena- γ del receptor Fc.

Como se divulga en la presente, un polinucleótido exógeno significa un polinucleótido que se introduce artificialmente en una célula huésped. Cuando las células humanas se usan como células, los genes humanos se introducen en las células humanas. En tal combinación, un polinucleótido artificialmente introducido significa el polinucleótido exógeno. Por lo tanto, la expresión ectópica del ILT7 humano o cadena- γ del receptor Fc humano se incluye en la expresión del polinucleótido exógeno.

Como se utiliza en la presente, el término “dominio extracelular del ILT7 humano” significa la secuencia de aminoácidos desde la posición 17 a 444 de la secuencia de aminoácidos descrita en la sec. con núm. de ident.:2 que se corresponde con el dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos (de 1 a 428 en la sec. con núm. de ident.:2). Como una secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de ILT7 humano, se prefiere usar la secuencia de aminoácidos que incluye cada región, por ejemplo, comenzando a partir del N terminal, en el siguiente orden:

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

Alternativamente, una secuencia de aminoácidos, que carece parcialmente de una región intracelular que se describe más abajo, se incluye en la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano.

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

Además, una estructura, que carece de una región intracelular como se menciona más abajo, se incluye en la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano.

[Secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana]

En la estructura, las regiones distintas al dominio extracelular pueden ser secuencias de aminoácidos que se seleccionan a partir de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident.:2, o se puede combinar con otras secuencias de aminoácidos que tienen homología con las regiones. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que forma una secuencia señal, un dominio transmembrana, y una región intracelular puede ser una secuencia de aminoácidos de la familia de moléculas de ILT distinta a ILT7. O, se puede combinar con la secuencia de aminoácidos de la familia ILT en especies distintas al humano. Más aun, la secuencia de aminoácidos, que constituye regiones distintas al dominio extracelular, puede incluir una mutación en el intervalo capaz de mantener la función de cada región. Alternativamente, otras regiones pueden intervenir entre cada región. Por ejemplo, una etiqueta de epítipo tal como FLAG se puede insertar además entre la secuencia señal y el dominio extracelular. Particularmente, la secuencia señal se elimina mediante el proceso durante su transferencia a la superficie de la membrana celular después que se traduce en proteína. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos arbitraria, que induce el tránsito de la proteína traducida a la membrana celular, puede usarse como la secuencia señal. Más específicamente, se prefiere usar la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:2) del ILT7 humano como la secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano.

Por lo tanto, en la presente divulgación, una secuencia base arbitraria que codifica la secuencia de aminoácidos que forma la estructura mencionada anteriormente [secuencia señal + dominio extracelular + dominio transmembrana + región intracelular] puede usarse como el polinucleótido que constituye el polinucleótido exógeno descrito en (a). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:2 se codifica por la secuencia base descrita en la sec. con núm. de ident.:1.

En la presente divulgación, un vector de expresión que porta expresivamente los polinucleótidos mencionados anteriormente (a) y (b) se pueden introducir a una célula huésped adecuada para obtener una célula transformada que se usa como un inmunógeno. Los polinucleótidos (a) y (b) pueden portarse en un vector o vectores diferentes. Cuando cada polinucleótido se porta en diferentes vectores, las células huéspedes se co-transfectan con dos tipos de vectores.

Los ejemplos preferidos de la célula huésped en la presente divulgación incluyen las células de mamífero. Los ejemplos específicos de la célula huésped incluyen las células derivadas de humanos, monos, ratones o ratas. Particularmente, las células derivadas de los humanos se prefieren como células huéspedes. Por ejemplo, se prefiere usar las células 293T derivadas de humanos como la célula huésped en la presente divulgación. Las células 293T se pueden obtener como ATCC

CRL-11268. Adicionalmente, las células derivadas de animales inmunes se pueden usar además como células huéspedes. Cuando se usan las células derivadas de animales inmunes como inmunógenos, se administra poca respuesta inmunológica a las células huéspedes. Por esa razón, un anticuerpo contra el dominio extracelular de ILT7 expresado de forma exógena se puede obtener de manera eficiente. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se usan ratones como animales inmunes, las células derivadas de ratones se pueden usar además como células huéspedes.

Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden transformarse en células que los portan en un vector capaz de inducir la expresión en las células huéspedes. Los vectores disponibles en el comercio, que pueden inducir la expresión en las células de mamífero, se pueden usar. Los vectores de expresión tales como vector pCMV-Script(R), vector PSG5 (fabricado por Stratagene), pcDNA3.1 (fabricado por Invitrogen) se pueden usar para la presente divulgación.

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

En la presente divulgación, las células productoras de anticuerpos recuperadas se clonan para proporcionar anticuerpos monoclonales. Se prefiere que las células productoras de anticuerpos se immortalicen para la clonación. Por ejemplo, el método de fusión celular como se tipifica por el método de hibridoma o transformación por el virus de Epstein-Barr (EBV) se puede usar como el método de immortalización de las células productoras de anticuerpos.

En cuanto a las células productoras de anticuerpos, una célula produce un tipo de anticuerpo. Por lo tanto, el establecimiento de poblaciones de células derivadas de una célula (es decir, la clonación) permite producir anticuerpos monoclonales. El método de hibridoma involucra el proceso en el que las células productoras de anticuerpos se fusionan con una línea celular adecuada, que se immortalizó y sometió después a la clonación. Las células productoras de anticuerpos immortalizados pueden clonarse mediante una técnica tal como el método de dilución limitante. Se conoce que existen grandes cantidades de líneas celulares útiles para el método de hibridoma. Estas líneas celulares son excelentes en la eficiencia de la immortalización de las células linfocíticas y tienen varios marcadores genéticos que son necesarios para seleccionar las células fusionadas con éxito. Más aun, cuando se pretende la producción de las células productoras de anticuerpos, puede usarse también una línea celular que carece de la capacidad de producir anticuerpos.

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

Los protocolos específicos de la fusión celular se han conocido públicamente. Esto es, las células productoras de anticuerpos de los animales inmunes se mezclan con parejas de fusión adecuadas para realizar la fusión celular. Los ejemplos idóneos de células productoras de anticuerpos incluyen células de bazo, células de linfocitos recogidas a partir de los ganglios linfáticos, y células B de sangre periférica. Como socios de fusión, varias líneas de células descritas anteriormente pueden usarse. El método de polietilenglicol y eléctrica pueden usarse para la fusión celular.

A continuación, sobre la base de los marcadores selectivos de las células fusionadas, se seleccionan las células fusionadas con éxito. Por ejemplo, cuando se usa la línea celular sensible a HAT para la fusión celular, las células fusionadas con éxito se seleccionan mediante la selección de las células que crecen en medio con HAT. Más aun, se confirmó que los anticuerpos producidos por las células seleccionadas tienen la sensibilidad deseada.

Cada hibridoma se tamiza basado en la sensibilidad de los anticuerpos. Esto es, el hibridoma productor de anticuerpos que se une al ILT7 humano se tamiza por el método como se describió anteriormente. Preferentemente, cuando se subclona el hibridoma seleccionado y después se confirma finalmente la producción del anticuerpo deseado, el anticuerpo confirmado se selecciona como un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal de la presente divulgación.

Específicamente, el hibridoma deseado puede seleccionarse sobre la base de la sensibilidad a las células humanas o la sensibilidad de la célula transformada que expresa el gen ILT7 humano. Los anticuerpos, que se unen a las células, se pueden detectar basados en el principio del inmunoensayo. Por ejemplo, el ELISA, que usa las células como antígenos, puede utilizarse para la detección del anticuerpo deseado. Específicamente, se prepara un sobrenadante de cultivo de

5 hibridoma para contactar con un soporte en el que la IPC humana o la célula transformada se usan como un inmunógeno. En el caso donde el sobrenadante de cultivo incluye el anticuerpo deseado, el anticuerpo se captura en la célula inmovilizada sobre el soporte. Después, la fase sólida se separa del sobrenadante de cultivo, que se lava, si es necesario. Después de eso, el anticuerpo capturado en la fase sólida puede detectarse. Un anticuerpo, que reconoce un anticuerpo, se puede usar para la detección de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo de ratón se puede detectar por un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón. La detección es fácil si el anticuerpo, que reconoce un anticuerpo, se marca. Los ejemplos idóneos del marcaje incluyen enzimas, colorantes fluorescentes, colorantes luminiscentes, y similares.

10 Por otra parte, las partículas y una pared interior de una placa de microtitulación se pueden usar como el soporte sobre el que se inmovilizan las células. Las células se pueden inmovilizar en partículas fabricadas con plástico o la superficie de un recipiente por adsorción física. Los ejemplos idóneos del soporte para la inmovilización de células incluyen perlas de poliestireno y recipientes de reacción.

15 En la selección de hibridomas, se puede predecir la producción del anticuerpo no contra ILT7 sino contra la célula huésped de la célula transformada usada como un inmunógeno. Por ejemplo, como se ilustra en los Ejemplos, en el caso donde se usa una célula humana como un inmunógeno y un ratón se usa como un animal inmune, la célula humana se reconoce como una sustancia extraña. Así, la producción de un anticuerpo, que se une a la sustancia extraña, se predice. En la presente divulgación, se pretende obtener un anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano. Por lo tanto, no es necesario obtener un anticuerpo que reconozca los antígenos de células humanas distintos a ILT7 humano. Para eliminar los hibridomas, que producen un anticuerpo de este tipo en el tamizaje, anticuerpos no deseados, se pueden absorber antes de la confirmación de la sensibilidad del anticuerpo.

20 Los anticuerpos no deseados se pueden absorber por un antígeno al que se une un anticuerpo que se presume existe. Específicamente, por ejemplo, un anticuerpo contra antígenos de células humanas distintas a ILT7 humano puede absorberse por una célula que no puede detectar la expresión del ILT7 humano. En la presente divulgación, se prefiere usar la célula huésped usada para el inmunógeno como antígeno para absorber los anticuerpos no deseados. Alternativamente, una célula huésped que no expresa el dominio extracelular del ILT7 humano, pero expresa la molécula que se asocia con ILT7 puede usarse como antígeno para absorber los anticuerpos.

30 En cuanto al anticuerpo monoclonal cuya actividad de unión al antígeno se confirma, su actual efecto sobre la actividad IPC se confirma, si es necesario. El efecto sobre la IPC puede confirmarse por métodos tales como los métodos descritos más abajo.

35 En cuanto al anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención, un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal se cultiva y el anticuerpo monoclonal de la presente invención se recupera del cultivo resultante. El hibridoma puede cultivarse in vitro o in vivo. En el caso de ensayos in vitro, el hibridoma puede cultivarse usando un medio de cultivo conocido, tal como RPMI 1640. La inmunoglobulina secretada por el hibridoma se acumula en el sobrenadante del cultivo. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención puede obtenerse recogiendo el sobrenadante del cultivo y purificando, si es necesario. Es más fácil purificar la inmunoglobulina cuando no se añade suero al medio de cultivo. Sin embargo, con el propósito de la más rápida proliferación del hibridoma y facilidad de producción de anticuerpos, 10% de suero fetal bovino puede añadirse también al medio de cultivo.

45 El hibridoma puede además cultivarse in vivo. Específicamente, el cultivo intraperitoneal del hibridoma puede prepararse inoculando el hibridoma en la cavidad abdominal de los ratones desnudos. Los anticuerpos monoclonales se acumulan en las ascitis. Por lo tanto, si la ascitis se obtiene y purifica según se necesite, se puede producir el anticuerpo monoclonal deseado. Los anticuerpos monoclonales obtenidos pueden ser adecuadamente modificados o procesados de acuerdo con el uso previsto.

50 El anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención se puede expresar mediante la obtención del ADNc que codifica la región de unión al antígeno del anticuerpo a partir del hibridoma e inserción en un vector de expresión adecuado. Se conoce la técnica, en la cual se obtiene el ADNc que codifica una región variable de anticuerpo y después se expresa en una célula huésped adecuada. Adicionalmente, se conoce además el método en el que un anticuerpo quimérico se prepara ligando una región variable que comprende la región de unión al antígeno en una región constante.

55 Los ejemplos preferidos del anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales producidos por el hibridoma #11 (número de acceso: FERM.BP-10704), hibridoma #17 (número de acceso: FERM BP-10705), o hibridoma #37. Las secuencias de aminoácidos que constituyen las regiones variables de estos anticuerpos monoclonales, así como secuencias base del ADNc que codifican éstos se describen más abajo. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos que se obtienen mediante la conjugación de estas regiones variables con las regiones constantes de otras inmunoglobulinas son preferidos en la presente divulgación. En las secuencias de aminoácidos descritas en la Lista de Secuencias, la secuencia de aminoácidos de 1 a C terminal constituye una proteína madura. Esto

es, la secuencia de aminoácidos consecutivos de 1 a C terminal para cada secuencia de aminoácidos es una secuencia madura de cada secuencia de aminoácidos. Por otra parte, la secuencia de aminoácidos representada por un valor numérico del N terminal a -1 es una secuencia señal.

Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
#11 Sec. con núm. ident.: 38 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 40 (secuencia base)
Sec. con núm. ident.: 39 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 41 (secuencia de aminoácidos)
#17 Sec. con núm. ident.: 42 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 44 (secuencia base)
Sec. con núm. ident.: 43 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 45 (secuencia de aminoácidos)
#37 Sec. con núm. ident.: 46 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 48 (secuencia base)
Sec. con núm. ident.: 47 (secuencia señal)	Sec. con núm. ident.: 49 (secuencia de aminoácidos)

Por ejemplo, un anticuerpo quimérico de ratón (región variable)-humano (región constante) se puede preparar ligando estos genes de región variable en una región constante de cadena pesada de IgG1 humana y un gen que codifica la región constante de cadena ligera kappa de Ig humana, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de tal anticuerpo quimérico y secuencias base que codifican los mismos se describen respectivamente más abajo. Los anticuerpos quiméricos especificados por estas secuencias muestran la construcción de una modalidad preferida de anticuerpo monoclonal anti-ILT7 para su uso en la presente invención. En las siguientes secuencias de aminoácidos de anticuerpos quiméricos, la secuencia de aminoácido de N terminal N a -1 corresponde con la secuencia señal y la secuencia de aminoácido de 1 a C terminal se corresponde con la proteína madura. Esto es, un anticuerpo quimérico que incluye de cadenas ligeras y pesadas, que consisten en la secuencia de aminoácidos de 1 a C terminal para cada secuencia de aminoácidos, es preferido en la presente invención.

Cadena pesada	Cadena ligera
#11 Sec. con núm. ident.: 50 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 52 (secuencia base)
Sec. con núm. ident.: 51 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 53 (secuencia de aminoácidos)
#17 Sec. con núm. ident.: 51 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 56 (secuencia base)
sec. con núm. de ident.: 55 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 57 (secuencia de aminoácidos)

Más aun, la actividad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal se puede injertar además a otras inmunoglobulinas. La región variable de inmunoglobulina incluye una región determinante de la complementariedad (CDR) y una región de marco. La propiedad de unión al antígeno de cada inmunoglobulina se determina por el CDR y el marco mantiene la estructura de la región de unión al antígeno. La secuencia de aminoácidos de la CDR es extremadamente rica en diversidad, mientras que la secuencia de aminoácidos de la porción del marco es altamente conservada. Se conoce que la secuencia de aminoácidos que constituye la CDR se incorpora en la región marco de otras moléculas de inmunoglobulina, lo que permite el injerto de la actividad de unión al antígeno. El método en el que se injerta la propiedad de unión al antígeno de diferentes inmunoglobulinas a la inmunoglobulina humana usando este proceso se ha establecido. Como se utiliza en la presente, el término "región de unión al antígeno" puede incluir el CDR que se injerta al marco. Por lo tanto, el término "fragmento que comprende la región de unión al antígeno" de un anticuerpo monoclonal determinado" incluye un fragmento de inmunoglobulina humana que comprende la región variable a la que se injerta el CDR del anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, cada una de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables anteriormente mencionadas incluye las siguientes secuencias de aminoácidos (sec. con núms. de ident.) como CDR.

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

Basado en la información de la secuencia base que codifica las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente y la información de la secuencia base que codifica el marco (FR) de la inmunoglobulina humana, se puede diseñar un cebador y

se puede amplificar el ADNc que tiene una secuencia base obtenida conjugando ambas secuencias base. La operación se repite para cada marco y se puede construir una región variable en la que CDR1, CDR2, y CDR3 de los ratones se conectan por el FR humano. Además, cuando la secuencia base, que codifica una región constante de inmunoglobulina humana, se conjuga según sea necesario, se puede obtener un anticuerpo humanizado con la región constante.

Como el anticuerpo quimérico que incluye las regiones variables mencionadas anteriormente, o un anticuerpo humanizado al que se injerta el CDR que constituye una región variable, un anticuerpo con una región constante derivada de IgG o IgM se incluye en un anticuerpo preferido para su uso en la presente invención. Los presentes inventores confirmaron que el anticuerpo monoclonal contra ILT7 mostró acción CDC en las células que expresan el ILT7. Por lo tanto, el anticuerpo que tiene una región constante derivada de IgG o IgM presenta citotoxicidad contra células que expresan el ILT7 debido al efecto de CDC. Tales anticuerpos son útiles en inhibir el número de células que expresan el ILT7 tales como las IPC.

El anticuerpo quimérico capaz de reconocer ILT7 o anticuerpos humanizados, que se proporciona para su uso en la presente invención, puede producirse por ingeniería genética usando los polinucleótidos que codifican estos anticuerpos. Por ejemplo, un polinucleótido que es la secuencia base descrita en las siguientes sec. con núms. de ident. y codifica la secuencia de aminoácidos que constituye una proteína madura por cada secuencia de aminoácidos puede usarse como un polinucleótido que codifica la región variable #11 o #17. La secuencia de aminoácidos consecutivos de 1 a C terminal para cada secuencia de aminoácidos corresponde a una proteína madura. En el caso donde cada proteína madura se expresa como una proteína separada, es preferible colocar la señal de secreción en el N terminal de cada secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, en las secuencias de aminoácidos que se muestran en estas sec. con núms. de ident., la secuencia de aminoácidos de N-terminal a -1 puede usarse como una secuencia de señal cuando tales proteínas se expresan en las células animales. Alternativamente, estas regiones variables pueden ser secretadas como proteínas maduras usando una secuencia de señal arbitraria que permite la secreción de la inmunoglobulina.

#11 sec. con núm. de ident.: 50 (secuencia base)

sec. con núm. de ident.: 52 (secuencia base)

#17 sec. con núm. de ident.: 54 (secuencia base)

sec. con núm. de ident.: 56 (secuencia base)

De la misma manera que se describió anteriormente, como para el polinucleótido que codifica el anticuerpo humanizado, se puede preparar un polinucleótido que expresa el anticuerpo humanizado usando la secuencia base que codifica una proteína que tiene la secuencia señal que se añade al N terminal. Cuando se portan las cadenas pesada y ligera en vectores separados, ambos vectores se co-transfectan en la misma célula huésped. Las cadenas pesada y ligera expresadas a partir de cada vector se usan para construir una molécula de inmunoglobulina con ambas cadenas. O, un polinucleótido que codifica una cadena pesada y un polinucleótido que codifica una cadena ligera puede portarse también en el mismo vector. La célula huésped en la que un vector que porta ambos polinucleótidos se co-transfecta expresa las cadenas pesada y ligera y produce una inmunoglobulina que tiene ambas cadenas.

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

Cada uno de los anticuerpos monoclonales producidos así se incluyen en el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal que se compone de una inmunoglobulina que incluye la región de unión al antígeno codificado por un polinucleótido derivado del ADNc que codifica la región de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente se incluye en el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención.

Como se describió anteriormente, las células RBL en las que el gen ILT1 se forzó a expresarse pueden usarse como un inmunógeno para obtener los anticuerpos contra ILT1. Sin embargo, la expresión de ILT7 en la superficie de las células RBL (P815) no se puede confirmar y así no puede usarse como inmunógeno. Los presentes inventores evidenciaron que la expresión del ILT7 humano en la superficie celular se puede inducir por la coexpresión del ILT7 humano y otras proteínas de membrana celular que se asocian con el ILT7 humano. Después, los presentes inventores encontraron que el anticuerpo, que se une a las IPC humanas, se puede obtener usando la célula transformada, cuya expresión se induce así como un inmunógeno.

Esto es, la presente divulgación proporciona el inmunógeno para producir el anticuerpo que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, y comprende las células animales en las que se mantienen (a) un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácido que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano, y (b) un polinucleótido que codifica la cadena- γ del receptor Fc tal que se exprese de modo exógeno o fracciones de membranas celulares de estos.

Seis años o más ya han pasado desde que se descubrió la estructura del ILT7 humano en 1998. Sin embargo, el anticuerpo capaz de reconocer específicamente al ILT7 no se ha obtenido aun. El anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano se proporcionó por primera vez usando el inmunógeno de la presente divulgación. Esto es, la presente divulgación proporciona el anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano que puede obtenerse por las siguientes etapas de:

(1) administrar una célula que expresa exógenamente una proteína que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano y una molécula que está asociada con el ILT7 humano para animales inmunes;

(2) seleccionar una célula productora de anticuerpo que produce el anticuerpo que se une al ILT7 humano a partir de las células productoras de anticuerpo de los animales inmunes; y

(3) cultivar las células productoras de anticuerpo seleccionadas por la etapa (2) y recuperar un anticuerpo capaz de reconocer el ILT7 humano a partir de los cultivos.

Se encontró que el ILT7 humano se expresa específicamente en IPC humana. En el análisis de la expresión génica por SAGE, que se realizó por los presentes inventores, se confirmó además la expresión específica del ILT7 humano en la IPC humana. Sin embargo, en los informes anteriores, se analizaron los niveles de expresión de ILT7 de ambos casos basados en el ARNm. Dado que el anticuerpo capaz de detectar el ILT7 humano no se proporcionó, el estado de expresión de la proteína no se analizó de forma convencional. El análisis de la proteína ILT7 humana se realizó por la provisión del anticuerpo que se une al dominio extracelular del ILT7 humano en la presente divulgación.

Los presentes inventores en realidad confirmaron que el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano basada en la presente divulgación detectó específicamente las IPC humanas. Esto es, la presente divulgación se relaciona con un método para detectar células productoras de interferón que incluye las etapas de: contactar un anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano o un fragmento que comprende la región de unión a antígeno con una célula de prueba; y detectar el anticuerpo monoclonal que se une a las células o un fragmento que comprende su región de unión al antígeno.

La detección de ILT7 humano basado en la presente divulgación permite determinar si una cierta célula es IPC. Esto es, la presente divulgación proporciona un método para identificar las IPC usando como un indicador el ILT7 humano. O, las IPC humanas pueden separarse mediante la separación de las células en las que se detectó el ILT7 humano basado en la presente divulgación. Esto es, la presente divulgación proporciona un método para separar las IPC usando como un indicador el ILT7 humano.

Basado en el análisis con el anticuerpo contra el ILT7 humano, se confirmó que se redujo el nivel de expresión de ILT7 en las IPC cuya diferenciación se indujo por CpG, y similares. Esto es, las IPC antes de que sea inducida su diferenciación pueden detectarse específicamente usando el ILT7 como un indicador. En otras palabras, el anticuerpo monoclonal para su uso en la presente invención es útil, particularmente para detectar las IPC antes de su diferenciación en células dendríticas. Como se utiliza en la presente, el término "IPC antes de su diferenciación" puede definirse como las poblaciones de células que mantienen la capacidad de producir interferón.

En la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular de ILT7 humano o el fragmento que comprende su región de unión al antígeno puede etiquetarse con antelación. Por ejemplo, los anticuerpos pueden detectarse fácilmente etiquetando con colorantes luminiscentes o colorantes fluorescentes. Más específicamente, se hace contactar el anticuerpo marcado con colorante fluorescente con una población de células que puede comprender las IPC y después las células a las que el anticuerpo para su uso en la presente invención se une puede detectarse usando como un indicador el colorante fluorescente. Más aun, las IPC pueden separarse mediante la separación de las células en las que se detecta el colorante fluorescente. Una serie de las etapas pueden realizarse fácilmente basadas en el principio de FACS.

Alternativamente, el anticuerpo para su uso la presente invención puede unirse con antelación a un soporte en fase sólida tal como partículas magnéticas. El anticuerpo unido al soporte en fase sólida reconoce el ILT7 humano y las IPC se capturan después en el soporte de fase sólida. Como resultado, las IPC pueden detectarse o separarse.

El anticuerpo necesario para el método detectar las IPC basado en la presente divulgación se puede proporcionar como un reactivo para detectar las IPC. Esto es, la presente divulgación proporciona un reactivo para detectar las células productoras de interferón, que comprende el anticuerpo monoclonal que se une al dominio extracelular del ILT7 humano o el fragmento que comprende su región de unión al antígeno. El reactivo para detectar las IPC de la presente divulgación se puede usar en conjunto con un control positivo o un control negativo, adicionalmente a los anticuerpos. Por ejemplo, las células transformadas que expresan el dominio extracelular del ILT7 humano y se usan para el inmunógeno, así como las IPC obtenidas a partir de humanos pueden usarse como controles positivos. Generalmente, sólo algunas de las IPC humanas pueden obtenerse a partir de sangre periférica. Por lo tanto, se prefiere usar, particularmente una célula transformada como

control positivo en el reactivo de la presente divulgación. Por otra parte, una célula arbitraria, que no expresa el ILT7 humano, puede usarse como el control negativo.

Esto es, la presente divulgación proporciona un estuche para detectar las IPC humanas que comprende:

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

(b) la célula que expresa una proteína exógena que comprende el dominio extracelular del ILT7 humano y una molécula exógena que se asocia con el ILT7 humano.

Los presentes inventores analizaron el efecto del anticuerpo que se une al dominio extracelular del ILT7 humano en las IPC. Como resultado, se confirmó que el anticuerpo, que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, inhibe la actividad de las IPC. O sea, la presente invención se relaciona con un método para inhibir la actividad de las células productoras de interferón, que comprende una etapa de contactar cualquiera de los siguientes componentes con células productoras de interferón:

(a) un anticuerpo monoclonal que se une al ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano y suprime la producción de interferón- α (IFN α) a partir de células que expresan el ILT7 o un fragmento que comprende su región de unión al antígeno; y

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

(a) el anticuerpo monoclonal que se une al ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano y suprime la producción de interferón- α (IFN α) a partir de células que expresan el ILT7 o un fragmento que comprende su región de unión al antígeno;

Como se utiliza en la presente, el término "células productoras de interferón (IPC)" significa las células que tiene la capacidad de producir IFN y expresar ILT7 en la superficie celular. De aquí en adelante, a menos que se denote de cualquier otra forma, el término "IPC" abarca no sólo las células que son células precursoras de células dendríticas sino también las células que tienen la capacidad de producir IFN y expresar ILT7 en la superficie celular. Los métodos para identificar tales IPC se conocen comúnmente. Las IPC pueden distinguirse de las otras células sanguíneas usando algunos marcadores de superficie celular como indicadores. Específicamente, un perfil de los marcadores de superficie celular de las IPC humanas se describe más abajo (Shortman, K. y Liu, YJ. Nature Reviews 2: 151-161, 2002). En años recientes, cierto reporte sugiere además que la célula positiva para BDCA-2 se define como IPC (Dzionek, A. y otros J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000.). [perfil de los antígenos de superficie celular de las IPC humanas] CD4 positivo, CD123 positivo, Linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) negativo, y CD11c negativo.

Por lo tanto, se puede decir además que las IPC son células que tienen el perfil de expresión de estos marcadores conocidos y tienen la capacidad de producir IFN. Más aun, las células en los organismos vivos con la capacidad para producir IFN se incluyen en las IPC, incluso si las células son una población de células con diferentes perfiles a partir del patrón de expresión del perfil de expresión de estos marcadores. Más aun, los ejemplos de las características, que se observan comúnmente en las IPC humanas, son como sigue:

[Características morfológicas de las células]

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

[Características funcionales de las células]

- Durante la infección viral, una gran cantidad de interferones Tipo-1 se producen en un corto periodo de tiempo.
- Diferenciadas en células dendríticas después de la infección viral.

Como se utiliza en la presente, el término “inhibición de la actividad de las IPC” significa la inhibición de al menos una de las funciones de las IPC. Los ejemplos de la función de las IPC incluyen la producción de IFN y la supervivencia celular. La supervivencia celular se puede traducir además en el número de células. Por lo tanto, en el caso de la inhibición de ambas o cualquiera de estas funciones, se dice que se inhibe la actividad de las IPC. Se ha encontrado que el IFN de tipo 1 producido por las IPC conduce a diversas enfermedades.

Por lo tanto, la inhibición del número de las IPC y producción de IFN es útil para una estrategia de tratamiento médico de esas enfermedades.

Por ejemplo, se ha indicado la relación entre la afección patológica de enfermedades autoinmunes e IFN α . La mayoría del IFN α se produce por las IPC. Por lo tanto, las afecciones patológicas causadas por IFN α pueden aliviarse mediante la inhibición de la producción de IFN α . Como se utiliza en la presente, el término “inhibición de la producción de IFN por las IPC” significa la inhibición de la producción de IFN α .

Esto es, la presente invención se relaciona con un inhibidor de la producción de IFN α que incluye un anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 como un ingrediente activo. O, la presente invención proporciona un método para inhibir la producción de IFN α que comprende una etapa de administrar el anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7. Más aun, la presente invención se relaciona con el uso del anticuerpo que se une al dominio extracelular de ILT7 en la producción de una composición medicinal para inhibir la producción de IFN α .

Las células en las que una gran cantidad de IFN se produce por un pequeño número de células se incluyen en las IPC. Por ejemplo, las células precursoras de células dendríticas estimuladas por virus y similares producen la mayoría del IFN producido por el cuerpo vivo. La inhibición del número de las IPC que producen gran cantidad de IFN resulta en la supresión de la producción de IFN. Por lo tanto, las afecciones patológicas causadas por IFN α pueden reducirse mediante la inhibición del número de las IPC. Se confirmó que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 se une a células que expresan ILT7 y después se proporcionó el efecto de citotoxicidad por la Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC) en una modalidad preferida de la presente invención. El efecto CDC es uno de los mecanismos importantes del fármaco anticuerpo. El anticuerpo monoclonal anti-ILT7 para su uso la presente invención tiene además una potente citotoxicidad contra las células que expresan el ILT7 tales como las IPC debido al efecto CDC de estas. Esto es, con respecto al anticuerpo monoclonal anti-ILT7, el efecto inhibidor de la producción de IFN puede esperarse por citotoxicidad contra las IPC, adicionalmente al mecanismo de inhibición de la producción de IFN en una modalidad preferida.

El anticuerpo, que reconoce el dominio extracelular del ILT7 humano que se usa por la presente invención, puede obtenerse basado en el método descrito anteriormente. El anticuerpo en la presente invención puede ser de cualquier clase. Las especies de organismos a partir de las que se deriva el anticuerpo no se limitan, tampoco. Más aun, un fragmento que comprende la región de unión al antígeno del anticuerpo puede usarse como un anticuerpo. Por ejemplo, un fragmento del anticuerpo que comprende la región de unión al antígeno que se obtiene por digestión enzimática de IgG puede usarse como el anticuerpo en la presente invención. Específicamente, los fragmentos de anticuerpos tales como Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse por digestión con papaína o pepsina. Se conoce bien que estos fragmentos de anticuerpos pueden usarse como moléculas de anticuerpos que tienen afinidad por anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos construidos por recombinación genética pueden usarse además, mientras se mantenga satisfactoria la actividad de unión al antígeno. Los ejemplos de los anticuerpos construidos por recombinación genética incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos con CDR trasplantados, Fvs de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos lineales, y anticuerpos poliespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Es de conocimiento común que estos anticuerpos pueden administrarse mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

En la presente invención, si es necesario, los anticuerpos pueden modificarse. De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo que reconoce el dominio extracelular del ILT7 humano, tiene un efecto inhibidor en la actividad de las IPC. Esto es, se contempla que el propio anticuerpo tiene citotoxicidad contra las IPC. Se conocen las subclases de anticuerpos que exhiben actividad efectora potente. Alternativamente, el efecto inhibidor en la actividad de IPC se puede mejorar aún más modificando los anticuerpos con un agente citotóxico. Se describen los ejemplos de agentes citotóxicos más abajo. Toxinas: Endotoxina de Pseudomonas (PE), toxina de la difteria, Radioisótopos de ricina: Tc^{99m}, Sr⁸⁹, I¹³¹, Y⁹⁰ Agentes contra el cáncer: caliquamicina, mitomicina, paclitaxel.

Las toxinas consistentes de proteínas pueden conjugarse a anticuerpos o sus fragmentos con un reactivo bifuncional. Alternativamente, un gen que codifica la toxina se conecta a un gen que codifica el anticuerpo y puede obtenerse además proteínas de fusión de ambos genes. Se conoce además el método para conjugar anticuerpos con radioisótopos. Por ejemplo, se conoce el método para marcar anticuerpos con radioisótopos usando un agente quelante. Además, los agentes contra el cáncer pueden conjugarse con anticuerpos usando cadenas de azúcar o el reactivo bifuncional.

Los presentes inventores han confirmado un fenómeno en el que un anticuerpo monoclonal que se une al ILT7 expresado en una membrana celular se incorpora en las células después de la unión (internalización). Por lo tanto, los agentes citotóxicos pueden entregarse en las células contactando los anticuerpos conjugados con estos agentes citotóxicos de la presente divulgación con células que expresan ILT7. Esto es, la presente divulgación proporciona un inhibidor activo de células que expresan el ILT7 que comprende el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 al que se conjuga el agente citotóxico como un ingrediente activo. O, la presente divulgación se relaciona con el uso de anticuerpo monoclonal anti-ILT7 al que el agente citotóxico se conjuga en la producción de las células que expresan el inhibidor activo de ILT7. Además, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de las células que expresan el ILT7 que comprenden una etapa de administración del anticuerpo monoclonal anti-ILT7 al que se conjuga el agente citotóxico.

En la presente invención, un anticuerpo cuya estructura se modifica artificialmente puede usarse además como un ingrediente activo. Por ejemplo, se conocen varios métodos de modificación para mejorar la citotoxicidad y estabilidad de los anticuerpos. Específicamente, se conoce una inmunoglobulina en la que las cadenas de azúcar de cadenas pesadas se modifican (Shinkawa, T. y otros J. Biol. Chem. 278:3466-3473, 2003.). La actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) mejoró por la modificación de las cadenas de azúcar. O, se conoce además una inmunoglobulina en la que la secuencia de aminoácidos de la región Fc se modifica. Esto es, la actividad ADCC mejoró al aumentar artificialmente la actividad de unión de la inmunoglobulina al receptor Fc (Shield, RL. y otros J. Biol. Chem. 276: 6591-6604, 2001.).

La IgG, que se une al receptor Fc, se incorpora una vez en las células. Después, la IgG se une al receptor Fc que se expresa en el endosoma y se libera de nuevo en la sangre. Este fenómeno ha sido revelado. La IgG con una alta actividad de unión con el receptor Fc tiene una mejor oportunidad de ser liberada a la sangre de nuevo después de su incorporación en las células. Como resultado, el tiempo de retención de IgG en sangre se extiende (Hinton, PR. y otros J Biol Chem. 279: 6213-6216, 2004). Adicionalmente a esto, se dice que la modificación de la secuencia de aminoácidos de la región Fc causa un cambio de la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Estos anticuerpos modificados pueden usarse como el anticuerpo en la presente invención.

Cuando el anticuerpo, que se une al dominio extracelular del ILT7 humano, se contacta con las IPC, se inhibe la actividad de las IPC. Por lo tanto, estos anticuerpos pueden usarse como un inhibidor o método para inhibir la actividad de las IPC. Esto es, la presente invención proporciona para el uso de un inhibidor activo de las IPC que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que consiste de los siguientes (a) como un ingrediente activo. O, la presente invención se relaciona con un método para inhibir la actividad de las IPC que comprende una etapa de administrar al menos un componente seleccionado del grupo que consiste de los siguientes (a). Además, la presente invención se relaciona con el uso de al menos un componente seleccionado del grupo consistente de las siguientes (a) en la producción del inhibidor activo de las IPC:

(a) el anticuerpo monoclonal que se une a ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano y suprime la producción de interferón- α (IFN α) a partir de células que expresan el ILT7 o un fragmento que comprende su región de unión al antígeno;

Puede confirmarse que los anticuerpos tienen un efecto inhibidor en la producción de IFN por las IPC tal como se describe más abajo. Las IPC producen una gran cantidad de IFN debido a la estimulación con virus. Los anticuerpos se administran a las IPC antes, después, o a la vez que la estimulación de las IPC con virus. La capacidad para producir cada IFN por las IPC resultantes se compara con aquella de cada control a las que no se administran los anticuerpos. La capacidad para producir IFN puede evaluarse midiendo el IFN α o IFN β contenido en el sobrenadante de cultivo de las IPC. Como resultado de la comparación, puede confirmarse que los anticuerpos probados son eficaces para inhibir la capacidad para producir IFN cuando la cantidad de IFN en el sobrenadante está significativamente disminuida por la adición de anticuerpos. Estos métodos para medir el IFN son conocidos. Las IPC producen la mayor parte del IFN en el cuerpo vivo. Por lo tanto, el estado de producción de IFN en el cuerpo vivo puede regularse mediante la inhibición de la capacidad para producir IFN de las IPC.

En la presente invención, la actividad de las IPC abarca el mantenimiento del número de las IPC. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de las IPC en la presente invención comprende la inhibición del número de las IPC. Cuando se confirma que el número de las IPC se inhibe en presencia de anticuerpos, se puede encontrar que los anticuerpos son los que inhiben la actividad de las IPC. Al igual que con la producción de IFN, una inmunoglobulina inerte derivada de la misma especie animal como el anticuerpo cuya actividad se debe confirmar puede usarse como un control comparativo. El número de las IPC puede compararse cuantitativamente contando las células. El número de células puede contarse con FACS o un microscopio.

Se dice además que las IPC se diferencian en células que inducen las Th2 conocidas como células dendríticas 2 (DC2) como un resultado de la infección con virus o similares. Si la producción de IFN de las IPC por estimulación con virus puede inhibirse, su diferenciación en Th2 puede inhibirse también. Por lo tanto, se puede esperar que el anticuerpo monoclonal

para su uso en la presente invención, que inhibe la producción de IFN, pueda tener además un efecto terapéutico en diversas enfermedades alérgicas.

5 Cuando el anticuerpo, que reconoce el dominio extracelular del ILT7 humano, se administra a un huésped diferente de las especies de organismos a partir de los que se deriva el anticuerpo, se prefiere procesar el anticuerpo en una forma que sea difícil que se reconozca como una sustancia extraña por el huésped. Por ejemplo, la inmunoglobulina no puede reconocerse fácilmente como la sustancia extraña por el procesamiento del anticuerpo en las siguientes moléculas. Se conoce la técnica para procesar las moléculas de inmunoglobulina como se describe más abajo. El fragmento que comprende la región de unión a antígeno que carece de una región constante, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, tercera edición, Academic Press Limited. 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)

10 El anticuerpo quimérico compuesto de la región de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal y la región constante de la inmunoglobulina del huésped ("Gene Expression Experiment Manual", Isao Ishida, Ando Tamie, editores, Kodansha, 1994)

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

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

25 Alternativamente, un gen de la región variable de inmunoglobulina humana puede obtenerse además por un método de presentación en fagos (McCafferty J. y otros, Nature 348: 552-554, 1990; Kretzschmar T y otros, Curr Opin Biotechnol. 2002 Dic.; 13(6): 598-602.). En el método de presentación en fagos, un gen que codifica la región variable de inmunoglobulina humana se incorpora en un gen de fago. Una genoteca de fagos puede producirse además usando varios genes de inmunoglobulina como salsas. Un fago expresa una región variable como una proteína de fusión de la proteína compuesta del fago. La región variable expresada por el fago en la superficie del fago mantiene la actividad de unión con un antígeno. Por lo tanto, los fagos, que se unen a antígenos o células en las que se expresan los antígenos, se seleccionan, permitiendo de ese modo tamizar un fago en el que se expresa una región variable que tiene la actividad de unión deseada a partir de la genoteca de fagos. Además, un gen que codifica una región variable, que tiene la actividad de unión deseada, se mantiene en las partículas de fago así seleccionadas. Esto es, en el método de presentación en fagos, un gen que codifica una región variable con la actividad de unión deseada puede obtenerse usando como un indicador la actividad de unión de la región variable.

30 En el inhibidor activo de las IPC o el método para inhibir la actividad de las IPC en la presente invención, el anticuerpo que reconoce el dominio extracelular del ILT7 humano o el fragmento de anticuerpo que comprende al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo puede administrarse como una proteína o un polinucleótido que codifica la proteína. En la administración de polinucleótidos, se prefiere usar un vector en el cual un polinucleótido que codifica la proteína deseada se coloca bajo el control de un promotor adecuado de manera de expresar la proteína deseada. Un potenciador y un terminador pueden colocarse también en el vector. Se conoce un vector que porta un gen de cadenas pesada y ligera que constituye una inmunoglobulina y es capaz de expresar una molécula de inmunoglobulina. El vector capaz de expresar la inmunoglobulina puede ser administrado por introducción en las células. En la administración a organismos vivos, un vector, que puede infectarse en con las células por la administración a los organismos vivos, puede administrarse directamente. Una vez que los linfocitos se separan de los organismos vivos, después el vector se introduce en los linfocitos, que se pueden devolver a los organismos vivos (ex vivo).

35 En el inhibidor activo de las IPC o el método para inhibir la actividad de las IPC basado en la presente invención, al igual que para la cantidad de anticuerpo monoclonal a administrar a los organismos vivos, la inmunoglobulina se administra generalmente en el intervalo de 0.5 mg a 100 mg, por ejemplo, 1 mg a 50 mg, preferentemente 2 mg a 10 mg por kg de peso corporal. Los intervalos de administración del anticuerpo a los organismos vivos puede ajustarse adecuadamente para mantener una concentración eficaz de inmunoglobulina en los organismos vivos durante el período de tratamiento. Específicamente, por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse a intervalos de 1 a 2 semanas. La vía de administración es opcional. Aquellos con experiencia en la materia pueden seleccionar adecuadamente una vía de administración eficaz en los tratamientos. Los ejemplos específicos incluyen administración oral o parenteral. Los anticuerpos se administran por vía sistémica o en forma tópica por ejemplo, por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares. Los ejemplos de un formulación adecuada para la administración parenteral en la presente invención incluyen soluciones inyectables, supositorios, y aerosoles. Cuando el anticuerpo se administra a las

células, la inmunoglobulina se añade al medio de cultivo generalmente en un intervalo de 1 µg/ML, preferentemente 10 µg/ML, con mayor preferencia 50 µg/ML, más preferentemente 0.5 mg/ML. En el inhibidor activo de las IPC o método para inhibir la actividad de las IPC de la presente invención, el anticuerpo monoclonal puede administrarse a los organismos vivos por métodos opcionales. Generalmente, el anticuerpo monoclonal se mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable. Si es necesario, el anticuerpo monoclonal puede mezclarse con agentes aditivos tales como espesantes, estabilizadores, conservantes, y solubilizadores. Los ejemplos de ese agente soporte o aditivo incluyen lactosa, ácido cítrico, ácido esteárico, estearato magnésico, sacarosa, almidón, talco, gelatina, agar, aceites vegetales, y etilenglicol. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de cada gobierno o enumerada en la Pharmacopeia en cada país u otra pharmacopeia generalmente reconocida para usar en animales, en mamíferos, y más particularmente, en humanos. El inhibidor activo de las IPC para su uso en la presente invención puede ser proporcionado además en forma de dosis únicas o múltiples de polvos liofilizados o tabletas. Más aun, los polvos liofilizados o tabletas pueden usarse en conjunto con agua esterilizada para inyección, solución salina fisiológica o solución tampón para disolver las composiciones para que tengan una concentración deseada antes de la administración.

Además, cuando el anticuerpo monoclonal se administra como un vector, que expresa inmunoglobulina, las cadenas pesada y ligera se co-transfectan a otro plásmido y cada plásmido puede administrarse en el intervalo de 0.1 a 10 mg, por ejemplo, 1 a 5 mg por kg de peso corporal. Para introducir los plásmidos en las células in vitro, el contenido de los vectores para usar es 1 a 5 µg/10⁶ células. Más abajo en la presente descripción, la presente invención será específicamente descrita con referencia a los Ejemplos.

Todos los documentos del arte anterior citados en la presente, se incorporan como referencia en su totalidad.

Ejemplos

Ejemplo 1

A. Análisis de la expresión de ILT7

A-1) Análisis usando la genoteca SAGE

La expresión de los genes en los monocitos humanos, las IPC, y las IPC tratadas con HSV se comparó y analizó por el método de Análisis en Serie de Expresión Génica (Nombre comercial; SAGE). El método de análisis es como sigue. Los monocitos se separaron como células BDCA-4 positivas y las IPC se separaron como células CD14 positivas a partir de sangre periférica humana usando un clasificador de células. Además, las IPC se cultivaron por 12 horas en presencia de Virus Herpes Simple (HSV) y se prepararon después las IPC diferenciadas. Los ARN se obtuvieron a partir de las células respectivas, seguido por la producción de una genoteca SAGE usando el estuche I-SAGE (Nombre comercial) (fabricado por Invitrogen). Los datos sobre las secuencias de bases obtenidas aproximadamente de 100,000 etiquetas se analizaron usando el Programa de Análisis SAGE (fabricado por Invitrogen). Como resultado, se encontró un gen cuyo valor de puntuación de monocito/IPC/IPC+HSV es 0/16/0, es decir, ILT7 (# de Acceso del Banco de Genes NM0_12276) conocido como un gen, que muestra la expresión específica IPC. ILT7 es una proteína de membrana con dominios de tipo inmunoglobulina codificados por una secuencia de bases que se muestra en la sec. con núm. de ident.:1 (Fig. 2(a)). Se reportó que el ARNm de ILT7 se expresa en las IPC (Blood 100, 3295-3303 (2002)).

A-2) RT-PCR.

La expresión de ILT7 en células de hemocito se examinó con más detalle. Cada célula se aisló de forma preparativa a partir de sangre periférica humana mediante el clasificador de células. Los ARN se extrajeron de cada una de las poblaciones de células aisladas, a partir de las cuales se sintetizó el ADNc. El PCR cuantitativo se realizó de acuerdo con un método ordinario usando el ADNc resultante como un molde y se analizó el nivel de expresión de ARNm de ILT7. Las condiciones usadas para las secuencias base de los cebadores y PCR son como sigue:

Cebador directo: 5' CTC CAA CCC CTA CCT GCT GTC 3' (sec. con núm. de ident.: 3)

Cebador inverso: 5' TTC CCA AGG CTC CAC CAC TCT 3' (sec. con núm. de ident.: 4) 1 ciclo de PCR (a 94°C por 3 minutos)

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

1 ciclo de PCR (a 72°C por 6 minutos)

Cuando las IPC estimuladas por monocitos, las IPC, los HSV, y las células CD19 positivas (es decir, células B), células CD3 positivas (es decir, células T), células T estimuladas por los PMA, y células CD56 positivas (es decir células NK) se examinaron, se encontró que ILT7 se expresó específicamente en las IPC (Fig. 1(a)).

5 A-3) RT-PCR cuantitativa

Además, la expresión en otros órganos y tejidos se examinó por PCR cuantitativa usando ABI PRISM 7000 (fabricado por Applied Biosystem). Como panel de ADNc, el panel de ADNc de múltiples tejidos MTC BD (Nombre comercial) (I Humano; Número de Catálogo 636742, Inmune humano; Número de catálogo 636748, Fracciones de sangre humana; Número de Catálogo. 636750; todos ellos se fabricaron por Becton Dickinson) y el mismo ADNc derivado de células de hemocitos como se describe en 2) se usaron.

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

- 15 Cebador directo para ILT7: 5' CCT CAA TCC AGC ACA AAA GAA GT 3' (sec. con núm. de ident.: 5)
- Cebador inverso para ILT7: 5' CGG ATG AGA TTC TCC ACT GTG TAA 3' (sec. con núm. de ident.: 6)
- 20 Cebador directo para GAPDH: 5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC 3' (sec. con núm. de ident.: 7)
- Cebador inverso para GAPDH: 5' TGG GAT TTC CAT TGA TGA CAA G 3' (sec. con núm. de ident.: 8)

La PCR se realizó usando ABI PRISM 7000 (fabricado por Applied Biosystem) y estuche de mezcla maestra de PCR SYBR verde (fabricado por la misma compañía). El Programa del Sistema de Detección de Secuencia (fabricado por la misma compañía) se usó para el análisis.

Las condiciones de la reacción son como sigue a continuación:

- 30 Etapa 1: 1 ciclo de PCR (a 50°C por 2 minutos)
- Etapa 2: 1 ciclo de PCR (a 95°C por 10 minutos)
- Etapa 3: 40 ciclos de PCR (a 95°C por 15 segundos, a 60°C por 1 minuto)

35 La expresión del gen de ILT7 se comparó entre cada tejido estandarizando el nivel de expresión del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se conoce que se expresa constitutivamente. Como resultado, se observó que ILT7 no se expresó en cualquiera de los órganos aparte de los tejidos linfoides y se expresó específicamente en las IPC.

40 B. Producción de ILT7 y vectores de expresión FcR γ

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

45 B-1) Clonación de los genes de ILT7

*ARN Poly (A) separado de la sangre periférica humana se extrajo de las IPC, del que se sintetizó ADNc usando el cebador oligo dT y el estuche para Síntesis de ADNc Super Script Choice System. Un adaptador EcoRI se ligó en el ADNc sintetizado, el que se ligó en el vector pME18S escindido por EcoRI, lo que resulta en la producción de la genoteca de ADNc de IPC humana. El gen de ILT7 se amplificó por el método de PCR usando la genoteca de ADNc producido como un molde, así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. 1 unidad de ADN-polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) se usó para la reacción de PCR. Las condiciones de reacción se establecieron a 25 ciclos de PCR [a 94°C por 15 segundos, a 55°C por 30 segundos, y a 68°C por 2 minutos] después de 1 ciclo de PCR a 94°C por 2 minutos. Cebador directo: 5' CAG GGC CAG GAG GAG GAG ATG 3' (sec. con núm. de ident.: 9) Cebador inverso: 5' TCA GCA GAC ACT TCC CCA ACT 3' (sec. con núm. de ident.: 10).

55 El fragmento de ADNc de 2 kb de ILT7 amplificado se separó y recuperó por electroforesis usando gel de agarosa al 1%, el que se clonó al vector plasmídico pCR4 Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen) usando el estuche de clonación de PCR TOPO Zero Blunt (fabricado por Invitrogen). Las secuencias de bases de los genes obtenidos se analizaron, y se encontró que se obtuvo el gen ILT7 deseado como se muestra en la sec. con núm. de ident.:1.

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

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

Para N-FLAG ILT7

Cebador directo (sec. con núm. de ident.: 11): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC CTG CTC TTC TTT GGG CTG AGC CTG GGC [GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG] CCC AGG ACC CGG GTG CAG GCA GAA 3'

Cebador inverso (sec. con núm. de ident.: 12): 5' C TAG act agt TCA GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

Para C-FLAGILT7

Cebador directo (sec. con núm. de ident.: 13): 5' CCG ctc gag ATG ACC CTC ATT CTC ACA AGC 3'

Cebador inverso (sec. con núm. de ident.: 14): 5' C TAG act agt TCA [CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC] GAT CTG TTC CCA AGG CTC 3'

En las secuencias de bases mencionadas anteriormente, cada parte subrayada en paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica la etiqueta FLAG unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se escindieron por XhoI y SpeI, los cuales se separaron después por electroforesis en gel. Fragmentos de ADN de 2 kb se recuperaron, los que se ligaron en el vector pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera como se describió anteriormente. Después, se construyeron dos tipos de plásmido capaces de expresar la proteína de fusión deseada, es decir, pME18X-N-FLAG ILT7 y pME18 X-C-FLAG ILT7, respectivamente.

B-3) Clonación de genes de FcR γ

La proteína FcR γ se consideró como una proteína capaz de asociarse con la proteína ILT7. La presente molécula es un gen con secuencias de bases y secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 15 y 16 (# de Acceso del Banco de Genes NM_004106, J. Biol. Chem. 265, 6448-6452 (1990)). La molécula es una molécula (cadena γ) que constituye Fc ϵ RI, es decir, un receptor de IgE de alta afinidad. Aunque se nombra además como Fc ϵ RI γ , se conocerá como FcR γ de aquí en adelante. En este sentido, la presente molécula ha sido conocida además como un componente de Fc γ R o Fc α R. El presente gen se clonó por el método de PCR, como se muestra más abajo para producir vectores de expresión. El gen de FcR γ se amplificó por el método de PCR usando la genoteca de ADNc de IPC humana producida como se describió en 1) como un molde, así como usando cebadores con las siguientes secuencias de base. 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) se usó para la reacción de PCR. Las condiciones de la reacción se establecieron a 25 ciclos de PCR [a 94°C por 15 segundos, a 55°C por 30 segundos, a 68°C por 1 minuto] después 1 ciclo de PCR a 94°C por 2 minutos.

Cebador directo: 5' CCC AAG ATG ATT CCA GCA GTG 3' (sec. con núm. de ident.: 17)

Cebador inverso: 5' GGA AGA ACC AGA AGC CAA AGA 3' (sec. con núm. de ident.: 18)

El fragmento de 0.3-kb de ADNc de FcR γ amplificado se separó y recuperó por electroforesis usando gel de agarosa al 2%, que se clonó al vector plasmídico pCR4 Blunt TOPO (fabricado por Invitrogen) usando el estuche de clonación PCR TOPO Zero Blunt (fabricado por Invitrogen). Las secuencias de bases de los genes obtenidos se analizaron, y se confirmó que el gen deseado FcR γ se clonó como se muestra en sec. con núm. de ident.:15.

B-4) Producción de vectores de expresión FcR γ etiquetados con Myc.

Un plásmido que expresa una proteína en la que la etiqueta Myc se unió al C terminal se construyó de manera que se pudo confirmar la expresión de la proteína F γ R. La secuencia deseada se amplificó por el método PCR usando el gen FcR γ producido como se describió en 3) como un molde, así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) se usó para la reacción de PCR. Las condiciones

se establecieron a 25 ciclos de PCR [a 94°C por 15 segundos, a 55°C por 30 segundos, y a 68°C por 1 minuto] después 1 ciclo de PCR a 94°C por 2 minutos.

Cebador directo (sec. con núm. de ident.: 19): 5' CCG ctc gag ATG ATT CCA GCA GTG GTC TTG 3'

Cebador inverso (sec. con núm. de ident.: 20): 5' CTA Gac tag tCT A[CA GAT CCT CTT CAG AGA TGA GTT TCT GCT C]CT GTG GTG GTT TCT CAT G 3'

De las secuencias de los cebadores mencionados anteriormente, la parte subrayada en paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica la etiqueta Myc unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se escindieron por XhoI y SpeI, los que se separaron después por Electroforesis en gel. Se recuperaron fragmentos de ADN aproximadamente de 0.3 kb, los que se ligaron en el vector de pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera como se describió anteriormente. Después, se construyó un plásmido capaz de expresar la proteína de fusión deseada, es decir, pME18X-Myc-FcR γ .

C. Expresión de ILT7 en células animales

La expresión de ILT7 en células animales se examinó usando vectores de expresión producidos como se describió anteriormente.

C-1) Expresión en células 293T

Los ADN consistentes de las cinco combinaciones siguientes se introducen en las células 293T (7×10^5 células) usando el estuche de transfección Effectene (fabricado por Qiagen). Dos días después de la introducción, se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo (análisis FCM).

(1) pME18X-N-FLAG ILT7 2 g

(2) pME18X-C-FLAG ILT7 2 g

(3) pME18X-N-FLAG ILT7 1 g + pME18X-Myc-FcR γ 1 g

(4) pME18X-C-FLAG ILT7 1 g + pME18X-Myc-FcR γ 1 g

(5) pME18X-Myc-FcR γ 2 g

El método de análisis FCM se llevó a cabo de la misma manera como se describe en A-4 del siguiente Ejemplo 2. El anticuerpo anti-Flag conjugado con Cy3 (fabricado por Sigma) se usó para la reacción y FACScan (fabricado por Becton Dickinson) se usó para el análisis. Como resultado, se encontró que sólo un poco de ILT7 se expresó en la superficie celular cuando reaccionó solo, mientras que ILT7 se expresó extracelularmente y robustamente cuando coexistió con FcR γ (Fig. 3). Se conoce que el FcR γ de ratón tiene alta homología con el FcR γ humano. Sin embargo, cuando se usaron células p815 (mastocitoma de ratón) que expresan FcR γ de ratón como huéspedes, no se pudo observar la expresión de ILT7.

C-2) Análisis por inmunoprecipitación y método de inmunoelectrotransferencia

ILT7 se expresó con FcR γ acompañante en la superficie celular, lo que se confirmó como sigue. Después de la inmunoprecipitación, se analizaron diversos anticuerpos para cada célula 293T que se coexpresó con ambos genes en las respectivas combinaciones descritas en (1) a (5). Los ADN se introdujeron en células 293T (7×10^5 células), a partir de lo que las células 293T se recuperaron dos días después de la introducción de la misma manera como describió en 1). Los fraccionamientos celulares se disolvieron en tampón de lisis (0.5% Triton, 150 mM NaCl), que se dejó en hielo por 20 minutos. Después de eso, la aspiración usando una aguja (27G) se repitió varias veces, seguido por centrifugación a 15 Krpm por 20 minutos. El anticuerpo anti-myc (2 g, fabricado por Santa Cruz Biotechnology) o anticuerpo anti-Flag (2 g, fabricado por Sigma) se añadió a 200 g de lisado de los productos resultantes, que se agitó además por rotación a 4 °C por 4 horas. Después, la mezcla de Proteína A/G Sepharose 4 Fast Flow (fabricado por Amersham Bioscience) se añadió a la misma, que se agitó por rotación a 4 °C durante 1 hora. Después, las fracciones precipitadas resultantes se lavaron 3 veces con tampón de lisis con la siguiente composición. tampón de lisis :

0.5% TritonX-100,

50 mM HEPES (pH 7.6),

150 mM NaCl,
 1 mM EDTA,
 10% glicerol,
 1 mM DTT,
 2 mM PMSF,
 1 g/ml Aprotinin,
 1 g/ml Leupeptin,
 1 g/ml Pepstatin A,
 0.1 g/ml Quimostatin,
 1 mM Na₃VO₄,
 0.1 mM β-glicerofosfato

Un tampón de muestra para SDS-PAGE se añadió a los precipitados lavados, lo que se hirvió por 5 minutos y centrifugó, seguido de la realización de electroforesis con gel de SDS 10%. Las muestras se transfirieron a partir de geles después de la electroforesis a una membrana de PVDF (membrana de transferencia Immobilon-p: fabricada por Millipore) de acuerdo con un método ordinario. La transferencia (a una membrana de filtro) se realizó con anticuerpo anti-Flag y anticuerpo anti-myc. Se confirmó que la ILT7 asociada con FcR γ estaba presente en las células 293T porque se observó su presencia en cada precipitado inmune (Fig. 4).

C-3) Análisis de la cadena de azúcar

Dado que se observaron varias bandas de ILT7 en el análisis de inmunoelectrotransferencia, se examinó la posibilidad de que ILT7 fuera glicosilada. 200 g de lisado de células 293T que expresan N-FLAG ILT7 y Myc-FcR γ se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-Flag de la manera como se describió en 1) y 2). Después de eso; las fracciones precipitadas se suspendieron en 60 l de tampón de N-glicosidasa con la siguiente composición y 30 μl de cada solución resultante se alicuotó en dos tubos. Tampón de N-glicosidasa:

10 mM EDTA,
 0.2% SDS,
 0.5% TritonX100,
 1% 2-mercaptoetanol en PBS (tampón fosfato)

Después, se añadieron a un tubo 3 unidades de 3 μl de N-glicosidasa (# 1365177, fabricado por Roche), lo que reaccionó a 37 °C por 15 horas. Más aun, 7 μl de tampón de muestra se añadió a la misma, lo que se calentó a 100°C por 5 minutos, seguido por la realización de electroforesis con gel de SDS 10%. Después de la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de PVDF, a la que se añadió 1 μg de anticuerpo policlonal anti-ILT7 como se describió en 4) y reaccionó a 4°C durante toda la noche. El producto resultante se lavó con tampón TBS-T y reaccionó con el anticuerpo anti-conejo marcado con HRP diluido 100,000 veces (fabricado por Jackson) a temperatura ambiente. Después, se coloreó con el Sistema de detección de Inmunoelectrotransferencia ECL (fabricado por Amersham Bioscience). Como resultado, el peso molecular aparente se redujo por la realización del tratamiento con N-glicosidasa. Así, se esperó que las cadenas de azúcar se añadieran a ILT7 (Fig. 5).

C-4) Producción de anticuerpo policlonal anti-ILT7

El anticuerpo policlonal anti-ILT7 usado como se describió en 3) se produjo como sigue. El péptido de 23 aminoácidos que corresponde al C terminal de ILT7 (CSQEANSRKDNAPFRWEPWEQI; sec. con núm. de ident.:21) se sintetizó químicamente y se unió a la proteína KLH que es una profesional, y el producto resultante se usó como inmunógeno. Los

conejos se inmunizaron por vía intradérmica con inmunógeno mezclado con adyuvante completo de Freund. Después de seis inmunizaciones en total (una vez por semana), se confirmó el título de anticuerpo aumentado en el suero y después se recogió la sangre completa. Después, un poco de suero se purificó por afinidad usando columna de péptido de la misma secuencia. El producto resultante se determinó como anticuerpo policlonal anti-ILT7.

Ejemplo 2

A. Producción de anticuerpo monoclonal anti-ILT7

A-1) Producción de Inmunógenos.

Las células que se usan como inmunógenos se prepararon introduciendo genes a las células 293T como se describe más abajo. 46.4 µg de transgén (23.2 µg de pME18X-C-FLAG ILT7 y 23.2 µg de pME18X-Myc-FcRγ) se añadió a la parte inferior de placa de 100 mm/cubiertas con colágeno (IWAKI) recubiertas con 3 ml de Opti-MEM (GIBCO) y se mezclaron. Posteriormente, aparte de la solución transgén, 58 l de Lipofectamine (Nombre comercial) 2000 (Invitrogen) se diluyó con 3 ml de Opti-MEM, que se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y se preparó la solución de Lipofectamine. Después de eso, la solución de Lipofectamine se añadió suavemente a la placa que contiene la solución del transgén y se mezcló. Después de permanecer a temperatura por 20 minutos, 10 ml de células 293T, diluidas a 1×10^6 células/ML usando medio de cultivo DMEM (Sigma) que contiene 10% FBS (suero fetal bovino), se añadió suavemente a la placa. El medio resultante se sometió a cultivo estático en una incubadora a 37 ° C en CO₂ por 48 horas, a partir de lo que se recuperaron las células por pipeteo. Las células obtenidas se usaron como transfectantes para los inmunógenos.

A-2) Producción de hibridomas

En el día antes de que se inmunizaron con las células, 50 l de emulsión obtenida por la mezcla de 200 l de PBS con 200 l de adyuvante completo (FREUND) (M606-1, fabricado por Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc.) se inyectó a las partes inferiores de ambas patas de cuatro ratones hembra Balb/c (de cuatro semanas de edad) para la inmunización. En el día siguiente, se inmunizó 50 l de 2×10^7 células suspendidas en 400 l de PBS. Las segunda y tercera inmunizaciones se realizaron cada cuatro días. Tres días a continuación de la tercera inmunización, se realizó la fusión celular como sigue. Se recogieron las células de los nódulos linfáticos de ratones inmunizados en las patas. Las células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8-U1 cultivadas en medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) que contiene 10% FBS se mezclaron con las células derivadas de los nódulos linfáticos y mieloma para que la relación de células de mieloma de ratón con las células derivadas de nódulos linfáticos y mieloma deban ser 2:1 a 10:1, a partir de que las células se recuperaron por centrifugación. PEG4000 (MERCK) diluido equivalentemente con medio de cultivo RPMI 1640 se añadió a las fracciones de células obtenidas, lo que se sometió a fusión celular. Después de lavar las células, el producto resultante se suspendió en 160 ml de 15% FBS-medio HAT que contiene un suplemento y se inocularon después en dieciséis placas de 96 pocillos a 200 l/pocillo. El medio de cultivo se cambió después de tres días. Una o dos semanas después de la observación de la formación de colonias, se realizó el tamizaje primario.

A-3) Tamizaje de hibridoma por el método ELISA de Células

El hibridoma, que produce el anticuerpo objetivo, se tamizó por el siguiente ELISA de células. Las células producidas como se describió en 1) se usaron a 1×10^7 células por placa de 96 pocillos, las que se suspendieron en 0.5% de BSA /2 mM EDTA /PBS y se alicuotaron después a una placa para ELISA de células (NUNC 249570 96V NW PS) a 100 l/pocillo. La centrifugación se llevó a cabo a 2,000 rpm a 4°C y se desechó después el sobrenadante. El sobrenadante de cultivo de la muestra se añadió a 50 µl/pocillo, lo que reaccionó a temperatura ambiente por 30 minutos. La operación de lavado que involucra adicionar 0.5% BSA/2 mM y EDTA/PBS a cada pocillo, centrifugar a 2,000 rpm a 4°C por 2 minutos, y desechar después el sobrenadante se llevó a cabo dos veces. 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG ratón marcado con peroxidasa diluido 10,000 veces (IM0819; Beckman Coulter) se añadió a cada pocillo después del lavar, lo que se reaccionó por 30 minutos. La operación de lavado usando 0.5% BSA/2 mM-EDTA/PBS se llevó a cabo dos veces, seguido por la adición de una solución colorante. La solución de anticuerpo preparada se sustituyó con PBS (-) por una membrana de diálisis (10.000 de tamaño cortes fabricado por PIERCE) para administrar anticuerpos quiméricos anti-ILT7 purificados.

A-4) Examen de la sensibilidad de los anticuerpos por análisis de citometría de flujo (FCM)

El sobrenadante de cultivo del hibridoma se analizó por análisis de citometría de flujo (FCM). Las células producidas como se describió en 1) se suspendieron en 0.5% BSA /EDTA 2 mM/PBS, lo que se transfirió en un tubo de centrifuga a 1×10^5 por muestra, seguido por la adición de 40 l de cada cultivo y reaccionando a temperatura ambiente por 30 minutos. La operación de lavado que involucra adicionar 1 ml de 0.5% BSA /2 mM y EDTA /PBS a cada tubo, centrifugar a 1200 rpm a 4°C por 3 minutos, y desechar el sobrenadante se llevó a cabo dos veces. 40 l del anticuerpo de cabra anti- IgG de ratón marcado con FITC (IM0819; Beckman Coulter) diluido 100 veces se añadió a cada pocillo después de lavar, lo que se

reaccionó a temperatura ambiente por 30 minutos. La operación de lavado usando 0.5% BSA /2 mM-EDTA/PBS se llevó a cabo dos veces, seguido por análisis usando citometría de flujo FC500 (Beckman Coulter). Se seleccionó un hibridoma que produce un anticuerpo que no respondió a solamente la célula huésped y respondió específicamente a la célula en la que se introdujo el gen. El hibridoma seleccionado se clonó por el método de dilución limitante y se obtuvieron los hibridomas #11 y # 17 que producen anticuerpos monoclonales.

B. Examen de la sensibilidad del anticuerpo anti-ILT7

ILT7 en el que la etiqueta FLAG se unió al N terminal se coexpresó con la molécula de FcR γ en las células 293T de la misma manera como se describió en C-1) del Ejemplo 1. Después, la sensibilidad del anticuerpo obtenido en el Ejemplo 2 se confirmó por análisis FCM usando FACScan (Becton Dickinson). Como resultado, se confirmó que todos los anticuerpos producidos por los hibridomas #11 y #17 que se obtuvieron como se describió en A respondieron a las células en las que se introdujo el gen ILT7 y que expresa ILT7 (Fig. 6 (b)). Más aun, se separaron los linfocitos de sangre periférica humana usando Ficoll y se realizó después doble tinción con el anticuerpo anti-ILT7 producido y anticuerpo anti-BDCA-2 marcado con PE (Milenyi). Después, se examinó la sensibilidad a los linfocitos. Como resultado, se detectó la unión del anticuerpo monoclonal producido por los hibridomas #11 y #17 a la célula BDCA-2 positiva. Esto es, se confirmó que ambos anticuerpos monoclonales reconocen moléculas ILT7 expresadas en las IPC humanas (Fig 6 (a)). Estos anticuerpos monoclonales se designaron como anticuerpo #11 anti-ILT7 y anticuerpo #17 anti-ILT7, respectivamente. Un análisis más detallado se realizó.

El análisis de múltiple-tinción de linfocitos de sangre periférica humana se llevó a cabo usando el anticuerpo anti-ILT7 producido, anticuerpo anti-Linaje-1 (anticuerpos anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD56; Becton Dickinson), anticuerpo anti-CD123 (Becton Dickinson), y anticuerpo anti-BDCA-2 (Milenyi). En cuanto a las fracciones positivas al anticuerpo ILT7, el marcador de linaje fue negativo, CD123 fue positivo, y BDCA-2 fue positivo. A partir de los resultados, se confirmó que las IPC se tiñeron por solamente ILT7 #11 e ILT7 #17 (Fig. 7).

Además, la expresión de diversas moléculas se examinó por análisis FCM cuando los linfocitos de sangre periférica humana se estimularon por CpG o IFN α por 24 horas. CpGODN2216 se usó como CpGA, lo que induce la producción de IFN a partir de las IPC y CpGODN2006, se usó como CpGB lo que facilita la maduración de las células dendríticas (Moseman y otros J. Immunology. 173, 4433-4442, 2004). Un canal se ajustó a la fracción negativa del marcador del Linaje. Cuando se analizó la sensibilidad del anticuerpo anti-BDCA-2 y anticuerpo anti-ILT7 con la población celular CD123 positiva, la mayoría de las fracciones ILT7 positivas se desaparecieron aún después de 24 horas de estimulación con CpG. Por otra parte, algunas células de BDCA-2 se mostraron positivas después de 24 horas de estimulación con CpG (Fig. 8). Se ha considerado que las IPC se diferencian en diferentes células inmediatamente después de la estimulación con CpG. Se indicó que el anticuerpo anti-ILT7 para su uso en la presente invención fue útil como un anticuerpo específico a la etapa para las IPC. Más aun, se confirmó que las IPC en linfocitos de sangre periférica no se diferenciaron en presencia de IFN α , en este caso donde la relación de supervivencia fue alta, se mantuvo la expresión de ILT7 en las IPC, además ILT7 estaba presente de forma estable en las IPC en enfermedades autoinmunes, con la posibilidad de que el IFN en el suero estaba en un nivel alto.

C. Examen de especificidad de anticuerpo anti-ILT7

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

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

Se sintetizó ADNc a partir de ARN derivado de amígdala humana usando cebador oligo dT y Sistema SuperScript Choice para el estuche de Síntesis de ADNc. A continuación, un adaptador NotI se ligó en el vector pME18S escindido por NotI, lo que resulta en la producción de genoteca de ADNc de amígdala humana.

El gen ILT1 con una etiqueta FLAG en el C terminal se amplificó por el método de PCR usando la genoteca de ADNc producido como un molde, así como usando cebadores con las siguientes secuencias de bases. 1 unidad de ADN polimerasa KOD Plus (fabricada por TOYOBO CO., LTD.) se usó para la reacción de PCR. Las condiciones de reacción se establecieron a 25 ciclos de PCR [a 94°C por 15 segundos, a 55°C por 30 segundos, y a 68°C por 2 minutos] después de 1 ciclo de PCR a 94°C por 2 minutos.

Cebador directo (sec. con núm. de ident.: 22): 5' CCG ctc gag ATG ACC CCC ATC CTC ACG GTC C 3'

Cebador inverso (sec. con núm. de ident.: 23): 5' CTA Gac tag tTC A[CT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT C]CC TCC CGG CTG CAT CTT G 3'

En las secuencias de los cebadores mencionados anteriormente, la parte subrayada en paréntesis muestra una secuencia de bases que codifica la etiqueta FLAG unida y cada letra minúscula muestra el sitio de escisión para la enzima de restricción XhoI o SpeI. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR se escindieron por XhoI y SpeI, que se separaron después por electroforesis en gel. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 2-kb se recuperaron los que se ligaron en el vector pME18X escindido por XhoI y SpeI de la misma manera como se describió anteriormente. Después, se construyó un plásmido capaz de expresar la proteína de fusión deseada, es decir, pME18X-C-FLAGILT1. La secuencia de bases y secuencia de aminoácidos se muestran en la sec. con núms. de ident.: 24 y 25.

C-2) Producción de las células que expresan y examen de la sensibilidad de anticuerpos

En cuanto a ILT2 (sec. con núm de ident: 26) e ILT3 (sec. con núm de ident: 28), se usaron vectores de expresión en el que los respectivos genes se clonaron a sitios XbaI y XhoI de ADNpc4.1 (fabricado por Invitrogen). Los ADN de las siguientes combinaciones se introdujeron en células 293T (7×10^5 células) de la misma manera como se describió en C-1). Dos días después de la introducción, se llevó a cabo el análisis FCM y se analizó después el anticuerpo anti-ILT7.

(1) pME18X-N-FLAG ILT7 1 µg + pME18X-Myc-FcRγ 1 µg

(2) pME18X-C-FLAG ILT1 0.5 µg + pME18X-Myc-FcRγ 0.5 µg + pcDNA4.1-ILT2 0.5 µg + pcDNA4.1-ILT3 0.5 µg

Como resultado, algunos anticuerpos no respondieron a las células en las que se expresó ILT1. Por esta razón, se sugirió que estos anticuerpos anti-ILT7 reconocen específicamente moléculas ILT7 en las IPC (Fig. 10).

Ejemplo 3

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

Linfocitos de sangre periférica humana se inocularon en placas de 96 pocillos a 2×10^5 células/pocillo, los que se reaccionaron con 5 µg/ml de diversos anticuerpos a 37°C. Después del cultivo por 1 hora, se añadió a la misma el virus de la gripe PR8. Después del cultivo por 24 horas, se midió IFNα en el sobrenadante del cultivo por el estuche de ELISA (Bender Med System). Como resultado, la producción de IFN se inhibió por la adición del anticuerpo anti-ILT7 (Fig. 11). Es decir, quedó en evidencia que la producción de IFN por las IPC se afectó por el anticuerpo anti-ILT7 para su uso en la presente invención.

Ejemplo 4

Actividad CDC del anticuerpo anti-ILT7

A. Producción del anticuerpo monoclonal anti-ILT7

Un clon que produce un anticuerpo monoclonal se obtuvo de la misma manera como se describió en A-1) a A-4) del Ejemplo 2. La sensibilidad se examinó de la misma manera como se describió en B del Ejemplo 2 y la especificidad se examinó de la misma manera como se describió en C del Ejemplo 2. Como resultado, se obtuvieron los hibridomas #37, #28, y #33, que producen anticuerpos monoclonales anti-ILT7 con buena sensibilidad y especificidad. La actividad CDC se midió como se describe más abajo usando el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 en el que se produjeron tres tipos de estos hibridomas.

B. Determinación de la actividad CDC

B-1) En el día anterior a la producción de la producción objetivo de la línea celular objetivo (línea celular ILT7-CHO), el siguiente ADN se introdujo en las células CHO-K1, que se inocularon para que tengan 6×10^5 células por un placa (6 cmφ) usando el Reactivo de Transfección Effectene (fabricado por QLAGEN) y, se seleccionaron después cepas resistentes usando 800 Lg/ml de Zeocina (fabricado por Invitrogen).

ADN introducido: pcDNA3.1-C-FLAG ILT7 1 µg + pME18X-Myc FcRγ 2 µg

Después de eso, se obtuvo una línea celular, que expresa altamente ILT7 usando el clasificador de células (BD FACSAria, fabricado por Becton Dickinson). Se confirmó por análisis FCM que la línea celular seleccionada expresó altamente ILT7. La operación de análisis FCM se llevó a cabo de acuerdo con el método como se describió en A-4) del Ejemplo 2 excepto que

se usó BD FACSCaliber (fabricado por BD) para FCM. Los siguientes anticuerpos se usaron como un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, respectivamente.

Anticuerpo Primario: 5 µg/ml anticuerpo de ratón anti-ILT7 (# 37),

Anticuerpo secundario: anticuerpo policlonal específico (BD) de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con R-ficoeritrina (R-PE)

B-2) Respuesta de las células objetivo a los anticuerpos anti-ILT7

Las células objetivos obtenidas como se describió en B-1) (célula ILT7-CHO) se recuperaron usando solución 5 mM EDTA /PBS, las que se suspendieron en medio CDC con la siguiente composición para que tengan una concentración de 4×10^5 células/ml. La suspensión se alicuotó en cada placa de 96 pocillos a 50µl/pocillo.

Medio CDC :

RPMI1640

0.1% BSA

100 unidades/ml Penicilina

100 µg/ml Estreptomicina

10 mM Hepes (pH 7.6)

2 mM L-Glutamina

50 µl de solución de anticuerpo anti-ILT7 preparado por medio CDC se añadió a cada pocillo y mezcló de manera que la concentración final de anticuerpos debe ser de 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, y 5 µg/ml. Además, 50 µl de medio CDC que contiene un complemento con la siguiente composición se añadió a la misma y mezcló de manera que la concentración final debe ser 6%, seguido por cultivo a 37 °C por 2 horas.

Medio CDC que contiene un complemento:

1 ml de complemento de conejo juvenil (Número de Catálogo: CL3441, fabricado por CEDARLANE)

Medio CDC (ver arriba)

Después, la suspensión se centrifugó (condiciones de centrifugación: a 250 G por 4 minutos) y el sobrenadante se recuperó prestando atención mientras para que no se contaminen con células LDH en el sobrenadante se midió por un método ordinario, que se determinó como "La cantidad de LDH que se escapa de la célula objetivo por la actividad del complemento (Muestra experimental).

Los siguientes parámetros se prepararon además para determinar la actividad CDC.

- Liberación de LDH espontánea de la célula objetivo: sólo las células objetivo se cultivaron y prepararon en el mismo volumen que la muestra.
- Liberación de LDH máxima de la célula objetivo: solamente las células objetivo se cultivaron en el mismo volumen que la muestra, y se incluyó con el estuche después la solución Triton X-100 que se añadió a la misma 60 minutos antes de la recuperación del sobrenadante y se preparó de manera que la concentración final debe ser 0.8%.
- Control para la corrección de volumen: la misma cantidad de Triton X-100 que el añadido cuando se preparó la Liberación de LDH máxima de la célula objetivo se añadió y preparó al medio de cultivo del mismo volumen que la muestra.
- Fondo del Medio de Cultivo: El medio de cultivo del mismo volumen que la muestra y la solución para el que el complemento que contiene medio CDC se añadió al medio de cultivo para que tengan el mismo volumen como se prepararon las muestras.

El mismo volumen de medio de cultivo que la muestra se restó a partir de la absorbancia del Máximo Objetivo y Espontáneo Objetivo. La solución a la que el complemento que contiene medio CDC se añadió al medio de cultivo para que tengan el mismo volumen que la muestra se restó y corrigió a partir de la absorbancia de la Muestra Experimental. La actividad de CDC se calculó por la siguiente ecuación. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Figura.12. Aun en el caso donde se usaron anticuerpos monoclonales anti-ILT7 obtenidos a partir de cualquier hibridoma, 80% o más de la actividad CDC se exhibió cuando la concentración de anticuerpo fue de 0. 5 µg/ml o más.

$$\text{Actividad CDC (\%)} = \frac{\text{Muestra experimental} - \text{Espontáneo objetivo}}{\text{Máximo Objetivo} - \text{Control volumen} - \text{Espontáneo objetivo}} \times 100$$

[Tabla 1]

	Concentración del anticuerpo (µg/ml)	Citotoxicidad (Promedio)	Citotoxicidad (STD)
#37	0.1	14.78	3.16
	0.5	85.50	0.60
	1	86.13	2.93
	5	90.26	1.87
#28	0.1	18.52	0.60
	0.5	80.97	1.62
	1	83.64	1.99
	5	88.17	3.32
#33	0.1	4.42	1.58
	0.5	82.16	3.35
	1	85.39	2.78
	5	86.18	1.71
IgG2A de ratón	0.1	1.53	0.60
	0.5	1.47	2.50
	1	3.68	2.90
	5	3.06	1.72
sin Ab	0	2.10	0.49

Ejemplo Comparativo 1

Exactamente la misma operación se realizó de la misma manera como se describió en B y C del Ejemplo 4, excepto que se usó IgG2a de ratón en lugar de anticuerpo anti-ILT7. Los resultados se muestran en el Ejemplo 4, así como la Tabla 5 y Fig. La actividad CDC para las células objetivo no se observó en otros anticuerpos que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7.

Ejemplo 5

Internalización del anticuerpo anti-ILT7 a las células objetivo

A. Anticuerpo monoclonal anti-ILT7

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

B. Observación de la internalización

B-1) Producción de la línea celular objetivo (línea celular ILT7-CHO)

La línea celular objetivo (línea celular ILT7-CHO) se produjo de la misma manera que se describió en B-1 del Ejemplo 4.

B-2) Respuesta de las células objetivo al anticuerpo anti-ILT7

Las células ILT7-CHO recuperadas se suspendieron en tampón helado (T (-) + 10% FBS) con la siguiente composición a 1×10^6 células/ml usando 5 mM de solución EDTA/PBS.

Medio T (-) :

RPMI 1640

100 unidades/ml Penicilina

100 µg/ml Estreptomicina

10 mM Hepes (pH 7.6)

2 mM L-Glutamina

1 mM piruvato sódico

50 M 2-mercaptoetanol

10% Suero Fetal Bovino inactivado por calor

1 ml de suspensión como se describió anteriormente se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml, que se centrifugó (condiciones de centrifugación: a 1200 rpm, a 4°C, por 5 minutos) y se desechó después el sobrenadante. 200 µl de la suspensión del anticuerpo monoclonal anti-ILT7 (10 µg/ml) se añadió a los sedimentos celulares, lo que se mezcló e incubó a 4°C por 30 minutos, seguido por lavado dos veces con medio T (-) helado (la cantidad del medio usado: 10 ml por lavado, condiciones de centrifugación: a 1200 rpm, a 4 °C, por 5 minutos).

B-3) Modificación del complejo inmune ILT7-anticuerpo anti-ILT7 presente en la superficie de las células objetivo

Posteriormente, el complejo inmune ILT7-anticuerpo anti-ILT7 presente en la superficie de las células se modificó con un anticuerpo secundario, que se marcó con fluorescencia para la detección. El método específico se describe más abajo. El anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón marcado con APC (Número de catálogo: 550826BD, fabricado por Biosciences) que contiene medio T (-) helado se añadió a los sedimentos celulares obtenidos como se describió en B-2), lo que se incubó con oscuridad a 4 °C por 20 minutos, seguido por lavado dos veces con medio T (-) helado (la cantidad del medio usado: 10 ml por lavado, condiciones de la centrifugación: a 1200 rpm, a 4°C, por 5 minutos). Después, se añadió el medio T (-) helado a la misma, que se usó como 1×10^6 células/ml de suspensión.

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

La suspensión obtenida como se describió en B-3 se dividió por igual en dos tubos (es decir, tubos (a) y (b)). Los tubos (a) y (b) se incubaron a 37 y 4°C, respectivamente, en condiciones de oscuridad por 60 minutos. Después de la incubación, 1% de FBS/PBS (helado) se añadió a la misma para detener la internalización. La solución resultante se centrifugó (condiciones de centrifugación: 1200 rpm, a 4°C, por 5 minutos) y se desechó después el sobrenadante, seguido de lavado dos veces con 1% FBS/PBS (helado) (la cantidad de la solución: 10 ml por lavado, condiciones de centrifugación: a 1200 rpm, a 4 °C, por 5 minutos).

B-6) Modificación del complejo inmune ILT7- anticuerpo-anti-ILT7 mantenido en la superficie de las células objetivo después de la incubación

El complejo inmune ILT7-anticuerpo-anti-ILT7 se mantuvo en la superficie celular después de la incubación que se modificó con un anticuerpo terciario para detectar, por fluorescencia. El método específico se describe más abajo. 20 µl de suspensión que contiene anticuerpos terciarios (anticuerpo de burro anti-IgG de cabra marcado con FITC (Número de

catálogo: sc-2024, fabricado por Santa Cruz Biotechnology)) se añadió a los sedimentos celulares obtenidos como se describió en B-4), lo que se mezcló y dejó reposar a 4°C por 15 minutos en condiciones de oscuridad. La solución resultante se lavó con (la cantidad de la solución: 10 ml por lavado, condiciones de centrifugación: a 1200 rpm, a 4 °C, por 5 minutos).

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

Posteriormente, se añadió 150 µl de 1% FBS/PBS a los sedimentos celulares obtenidos como se describió en B-5), lo que se suspendió y recogió en un tubo de microtitulación de 1.2 ml, seguido por la realización de análisis FCM. En el análisis, la intensidad de fluorescencia promedio (MPI) de cada célula se analizó por separado en FITC y APC. Más aun, la relación de intensidad de fluorescencia (%) se calculó por la siguiente ecuación.

$$\text{Relación de Intensidad de fluorescencia (\%)} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia promedio de células incubadas a } 37^{\circ}\text{C por 60 minutos}}{\text{Intensidad de fluorescencia promedio de células incubadas a } 4^{\circ}\text{C por 60 minutos}} \times 100$$

Los resultados se muestran en la Tabla 2, Tabla 3, y la Fig. 13.

[Tabla 2]

	FITC			APC		
	Intensidad de fluorescencia promedio		Relación de intensidad de fluorescencia (%)	Intensidad de fluorescencia promedio		Relación de intensidad de fluorescencia (%)
	Temperatura de incubación (°C)			Temperatura de incubación (°C)		
	4	37		4	4	
#17	35.7	15.9	44.5	1384	1320	95.4
#26	29.8	16.5	55.4	844	816	96.7
#37	51.0	28.5	55.9	2194	2155	98.2
#28	40.6	19.3	47.5	1746	1709	97.9
#33	47.7	22.6	47.4	1882	1845	98.0
IgG2a	3.7	4.2	116.2	3	3.64	121.3
		Especies de anticuerpos primarios	Relación de intensidad de fluorescencia (%)			
			APC		FITC	
Ejemplo 5		Anticuerpo #17 Anti-ILT7	95.4		44.5	
		Anticuerpo #26 Anti-ILT7	96.7		55.4	
		Anticuerpo #37 Anti-ILT7	98.2		55.9	
		Anticuerpo #28 Anti-ILT7	97.9		47.5	
		Anticuerpo #33 Anti-ILT7	98.0		47.4	
Ejemplo comparativo 2		IgG2a de ratón	121.3		116.2	

La intensidad de la fluorescencia de FITC es un indicador de la cantidad de complejo inmune ILT7-anticuerpo-anti-ILT7 mantenido en la superficie celular después de la incubación. La intensidad de fluorescencia promedio de FITC para las células incubadas a 37°C por 60 minutos cayó a aproximadamente 50% en comparación con las células incubadas a 4°C.

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de APC es un indicador de la cantidad de complejo inmune ILT7-anticuerpo-anti-ILT7 presentado en la superficie celular antes de la incubación. El complejo inmune ILT7-anticuerpo-anti-ILT7 se detecta a pesar de si está presente en la superficie celular o incorporado en las células después de la incubación. En el Ejemplo 5, la intensidad de fluorescencia de APC después de la incubación en el caso de la incubación a 37°C fue equivalente a esa en el caso de la incubación a 4°C. Esto muestra que el complejo inmune ILT7-anticuerpo-anti-ILT7 puede estar presente en cualquier sitio de las células objetivo, aun cuando la incubación se realiza a cualquier temperatura. Como se mencionó anteriormente, se encontró que el anticuerpo monoclonal anti-ILT7 provocó la internalización de ILT7 por la incubación a 37°C

Ejemplo comparativo 2

Exactamente la misma operación se realizó de la misma manera como se describió en el Ejemplo 5 excepto que se usó IgG2a de ratón en lugar del anticuerpo anti-ILT7. Los resultados se muestran en el Ejemplo 5, así como la Tabla 2, Tabla 3, y la Figura 13. En el caso donde se usó la IgG2a de ratón, no se observaron ningún cambio en la intensidad de fluorescencia de FITC y APC, así, se encontró que la IgG2a de ratón no provocó la internalización de ILT7.

Ejemplo 6

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

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

A-1) Respecto a los hibridomas que producen anticuerpos de ratón anti-ILT7

Los siguientes hibridomas se usaron como hibridomas que producen anticuerpos de ratón anti-ILT7.

- Hibridoma #11 (Número de acceso: FERM BP-10704)
- Hibridoma #17 (Número de acceso: FERM BP-10705)

A-2) Aislamiento de los ARN totales

Los ARN totales se aislaron a partir de hibridomas descritos en A-1) usando un estuche disponible en el comercio "Estuche RNeasy Mini" (Número de catálogo: 74106, fabricado por Qiagen) de acuerdo con las instrucciones adjuntas al estuche. En ambos casos, aproximadamente 200 µg de los ARN total se obtuvo a partir de 1×10^7 hibridomas.

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

El ADNc que codifica una región variable de la cadena pesada de ratón se amplificó por el método 5' RACE usando 5 µg de los ARN total aislados como se describió en A-2. En cuanto a la amplificación, el estuche disponible en el comercio "Estuche del Sistema 5' RACE para la Amplificación Rápida de terminales de ADNc, Versión 2. 0" (Número de catálogo: 18374-058, fabricado por Invitrogen) se usó. Se describirá específicamente como sigue. En primer lugar, una primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de los ARN total obtenidos como se describió en A-2) por la transcriptasa inversa. Las secuencias de bases de los cebadores antisentido (GSP1) usados en el momento se muestran en la Tabla 4.

Cebadores usados para la amplificación de un gen que codifica una región variable de cadena pesada de ratón			
Hibridomas usados	Nombres de los cebadores	Sec. con núm. de ident.	Secuencia
#11	Mu IgG3VH5RACE-GSP1	30	5' CCA TAG TTC CAT TTT ACA GTT ACC 3'
			(24-mer)
	Mu IgG3VH5RACE-GSP2	31	5' GGG ACC AAG GGA TAG-ACA GA 3'
			(20-mer)
#17	Mu tgG2aVH5RACE-GSP1	32	5' TCC AGA GTT CCA GGT CAA GGT CAC 3'
			(24-mer)
	Mu IgG2aVH5RACE-GSP2	33	5' GCC AGT GGA TAG ACC GAT GG 3'
			(20-mer)

Posteriormente, los ARN totales se degradaron por RNasaH y la primera cadena de ADNc se mantuvo como una sola cadena que se purificó por el método de agarosa de bajo punto de fusión (1.5%). Además, dC (es decir, homopolímero de nucleótidos) se adjuntó al terminal 3' de la primera cadena de ADNc usando la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Se amplificó el ADNc por el método de PCR usando unos cebadores de anclaje (sec. con núm. de ident.:34) que tienen un polímero de nucleótidos complementarios a dC (secuencia de anclaje) en el terminal 3' y los cebadores antisentido (GSP2) que se muestran en la Tabla 4. Además, los productos de PCR obtenidos se usaron como moldes. El ADNc se amplificó por el método de PCR anidada usando el cebador AUAP (sec. con núm de ident: 35) y los cebadores antisentido (GSP2) se muestran en la Tabla 4. Más aun, los productos de PCR se purificaron por el método de agarosa de bajo punto de fusión (1.5%).

Cebador de anclaje para 5'RACE (sec. con núm de ident.: 34)
5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3' (36-mer)

AUAP cebador para 5'RACE (sec. con núm. de ident.:35)
5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (20-mer)

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

El ADNc que codifica una región variable de cadena ligera de ratón se amplificó a partir de los ARN total aislado como se describió en A-2) de la misma manera como se describe en A-3). Las secuencias de bases de los cebadores usados en el momento se muestran en la Tabla 5. Los productos de PCR obtenidos se purificaron por el método de agarosa de bajo punto de fusión (1.5%).

[Tabla 5]

Cebadores usados para la amplificación de un gen que codifica una región variable de cadena ligera de ratón			
Hibridomas usados	Nombres de los cebadores	sec. con núm. de ident.	Secuencia
#11, #17	Mu IgVL5RACE-GSP1	36	5' TTC ACT GCC ATC AAT CTT CCA CTT 3'
			(24-mer)
	Mu IgVL5RACE-GSP2	37	5' GAT GGA TAC AGT TGG TGC AGC 3'
			(21-mer)

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

Una región variable de cadena pesada obtenida como se describió en A-3) y el fragmento de ADNc de la región variable de cadena ligera obtenida como se describió en A-4) se clonaron a vectores pCR4 Blunt-TOPO usando un estuche disponible en el comercio "Estuche de clonaje de PCR Zero Blunt TOPO" (Número de catálogo: 1325137, fabricado por Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones adjuntas al estuche, que se introdujo después en células competentes de Escherichia coli para administrar transformante de Escherichia coli. El plásmido mencionado anteriormente se obtuvo a partir del transformante, la secuencia de bases de ADNc en el plásmido se confirmó después usando un secuenciador de ADN automático "Analizador Genético ABI PRISM 3100 basado en PCR" (fabricado por Applied Biosystems). Las secuencias correctas se extrajeron excluyendo los transcritos obtenidos a partir de un ARN inactivo debido a cambio de marco y mutaciones sin sentido alrededor de la región determinante de la complementariedad (de aquí en adelante denominado como "región CDR"). Además, la homología de la secuencia de bases de ADNc comprendida en el plásmido se comparó con la base de datos Kabat y se determinaron las secuencias de la región CDR y la región variable en las respectivas regiones variables. Además, en cuanto al hibridoma #37 producido en el Ejemplo 4, las secuencias de la región CDR y la región variable en las regiones variables se determinaron en el mismo procedimiento como se describió en A-1) a A- 5) del Ejemplo 6 usando el hibridoma #17. Las secuencias de bases de ADNc de las regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de los anticuerpos monoclonales anti-ILT7 producidos por cada hibridoma y las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias se muestran en las siguientes sec. con núms. de ident.

	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
#11	Sec. con núm. ident.: 38 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 40 (secuencia base)
	Sec. con núm. ident.: 39 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 41 (secuencia de aminoácidos)

	Región variable de cadena pesada	Región variable de cadena ligera
#17	sec. con núm. de ident.: 42 sec. (secuencia base)	con núm. de ident.: 44 (secuencia base)
	Sec. con núm. ident.: 43 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 45 (secuencia de aminoácidos)
#37	Sec. con núm. ident.: 46 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 48 (secuencia base)
	Sec. con núm. ident.: 47 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 49 (secuencia de aminoácidos)

[Confirmación del isotipo de la región constante]

En cuanto al sobrenadante de cultivo de hibridoma, el isotipo de región constante del anticuerpo monoclonal producido se confirmó usando un estuche de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón disponible en el comercio (Número de catálogo: MMT1, fabricado por Serotec Product). La región constante de cadena pesada del anticuerpo #11 de ratón anti- ILT7 humano fue Ig 3 y la región constante de la cadena ligera fue Igk. Además, cada una de las regiones constantes de la cadena pesada del anticuerpo #17 de ratón anti- ILT7 humano y el anticuerpo # 37 de ratón anti-ILT7 humano fue Ig 2a y cada región constante de la cadena ligera fue Igk.

Ejemplo 7

Producción de anticuerpos quiméricos

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

La región constante de cadena pesada de IgG1 humana y la región constante de cadena ligera kappa de Ig humana se seleccionaron a partir de la genoteca de ADNc de las IPC humanas. Después, las regiones seleccionadas se clonaron a vectores pCR4 Blunt-TOPO usando un estuche disponible en el comercio "Estuche de clonaje de PCR Zero Blunt TOPO" (Número de catálogo: 1325137, fabricado por Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones adjuntas al estuche, que se introduce después en células competentes de Escherichia coli para administrar transformante de Escherichia coli. El plásmido mencionado anteriormente se obtuvo a partir del transformante, la secuencia de bases de ADNc en el plásmido se confirmó después usando un secuenciador de ADN automático "Analizador Genético ABI PRISM 3100 basado en PCR" (fabricado por Applied Biosystems).

B. Ligazón de la región variable con la región constante y clonación

El ADNc que codifica la región constante de cadena pesada obtenida como se describió en A y el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada obtenida como se describió en A-5 del Ejemplo 6 se usó, respectivamente. Ambos ADN tienen una región en la que una secuencia de bases de ADN se solapa. Después, el ADN de cadena doble se obtuvo por el método de extensión de solapamiento usando la región. El proceso específico es como sigue a continuación.

C-1) Preparación del ADNc que codifica la cadena pesada del anticuerpo quimérico ILT7

El "plásmido con ADNc que codifica las regiones variables de cadena pesada de #11 y #17" que se obtuvo como se describió en A-5) se digirió con las enzimas de restricción NotI y XbaI, lo que se purificó por el método de gel de agarosa (1.5%). Los productos resultantes se disolvieron en cada tampón TE con la siguiente composición para que tengan 100 pmol/l para preparar una solución del fragmento de ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada.

Tampón TE:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

pH 7.5 a 8.0

Más aun, el "plásmido con ADNc que codifica la región constante de cadena pesada" obtenido como se describió en B se trató de la misma manera que la descrita anteriormente para preparar 100 pmol/l de solución. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones, y ambas de las regiones de solapamiento se hibridaron después manteniéndolas primero a 70 °C por 10 minutos y luego manteniéndolas a 37 °C por 5 minutos. Después de eso, el ADNc se amplificó por el método de PCR y el ADNc obtenido se digirió con las enzimas de restricción NotI y XbaI, lo que se purificó por el método de gel de agarosa de bajo punto de fusión (1.5%).

C-2) Preparación de ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo quimérico ILT7

El ADNc que codifica la región constante de cadena ligera obtenida como se describió en A y el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera obtenida como se describió en A-5 del Ejemplo 6 se usó, respectivamente. El ADNc que codifica la cadena ligera del anticuerpo quimérico ILT7 se obtuvo de la misma manera como se describió en C-1) usando estos ADNc.

C-3) Clonación.

El ADNc obtenido como se describió en C-1) se clonó al vector plasmídico pADNc3.1-Zeocina (fabricado por Invitrogen) usando NotI y XbaI como sitios de clonación para producir un vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo ILT7 quimérico. Además, el ADNc obtenido como se describió en C-2) se clonó al vector plásmido pADNc3.1-higromicina (fabricado por Invitrogen) usando NotI y XbaI como sitios de clonación para producir un vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo ILT7 quimérico. Los nombres de cada vector se muestran en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Nombres de los vectores plasmídicos		
	Cadena pesada del anticuerpo quimérico ILT7 para la expresión	Cadena ligera del anticuerpo quimérico ILT7 para la expresión
#11	pcDNA-#11VH	pcDNA-#11VL
#17	pcDNA-#17VH	pcDNA-#17VL

D. Expresión del anticuerpo quimérico ILT7.

D-1) Transformación transitoria

1 µg de vector de expresión de la cadena pesada del anticuerpo quimérico ILT7 y 1 µg de vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo quimérico ILT7, que se obtuvieron como se describió en C-3), se co-transfectaron a las células 293T usando el estuche de transfección effectene (Número de catálogo: 301427, fabricado por Qiagen). Después de eso, los productos resultantes se cultivaron a 37°C usando medio de cultivo DMEM con 2% FBS de bajo contenido de IgG añadido con la siguiente composición.

medio de cultivo DMEM con 2% FBS de bajo contenido de IgG añadido:

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

2% FBS de bajo contenido de IgG (Número de catálogo: SH30151.03, fabricado por HyClone)

2 mM L-Glutamina

100 U/ml Penicilina

100 µg/ml Estreptomicina

pH 7.2 a pH 7.4

Después de la introducción de los vectores, el medio resultante se cultivó por 96 horas y se recogió el sobrenadante del cultivo. Después, los fragmentos de células se eliminaron por centrifugación para administrar una solución de anticuerpo crudo.

D-2) Transformación de la homeostasis

1 µg del vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo quimérico ILT1 y 1 g del vector de expresión de la cadena ligera del anticuerpo quimérico ILT7, que se obtuvieron como se describió en C-3), se co-transfectaron con células YB 2/0 (células derivadas de mieloma de rata, ATCC # CRL-1622) usando el estuche de transfección effectene (Número de catálogo: 301427, fabricado por Qiagen). Entre los vectores plasmídicos usados, el vector para la expresión de la cadena pesada es un marcador de resistencia a zeocina y el vector para la expresión de cadena ligera es un marcador de resistencia a higromicina. Por lo tanto, las células en los que se introdujeron ambos vectores pueden crecerse en un medio

de cultivo al que se añade a la vez Zeocina e higromicina. Después, las células se cultivaron en medio de cultivo RPMI al que se añadieron Zeocina e higromicina y se seleccionó una cepa resistente.

Medio de cultivo RPMI con Zeocina-higromicina añadida:

- 5 Medio de cultivo RPMI 1640 (Número de catálogo: R8758, fabricado por Sigma) 10% FBS
- 0.01 M HEPES (Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico)
- 10 1 mM Piruvato sódico
- 2 mM de L-Glutamina
- 100 U/ml Penicilina
- 15 100 µg/ml Estreptomicina
- 55 µM 2-mercaptoetanol
- 20 0.5 mg/ml Zeocina
- 0.5 mg/ml Higromicina
- pH 7.2 a pH 7.4

Tres días después de eso, la cantidad de producción de anticuerpo en el sobrenadante del cultivo se determinó por el método de ELISA. La línea celular que produce el anticuerpo quimérico ILT7 con un nivel de expresión alta y células suficientemente aumentadas se seleccionó. Además, una sola clonación de las líneas de células seleccionadas se realizó por el método de clasificador de células para obtener las siguientes líneas celulares.

- 30 Línea celular #11 que produce el anticuerpo quimérico ILT7 : línea celular 11-5 y
línea celular #11-16
- 35 línea celular #17 que produce el anticuerpo quimérico ILT7: línea celular #17-24

Las líneas celulares mencionadas anteriormente (línea celular# 11-5, línea celular # 11-16, y línea celular # 17-24) se cultivaron respectivamente en medio de cultivo RPMI con 5 % FBS añadido con la siguiente composición.

- 40 La temperatura de incubación y tiempo de incubación se establecieron a 37 °C y 96 horas, respectivamente.

Medio de cultivo RPMI con 5% FBS añadido:

- 45 Medio de cultivo RPMI 1640 (Número de catálogo: R8758S, fabricado por Sigma)
- 5% FBS
- 0.01 M de HEPES
- 50 1 mM Piruvato sódico
- 2 mM L-Glutamina
- 100 U/ml Penicilina
- 55 100 g/ml Estreptomicina
- 55 M 2-mercaptoetanol
- 60 pH 7.2 a pH 7.4

El sobrenadante de cultivo se recogió y después los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación para administrar una solución de anticuerpo crudo.

E. Purificación de anticuerpos

Cada una de las soluciones de anticuerpo crudos obtenidos como se describió en D-1 y D-2 se purificó por columna de afinidad de proteína A (rProteína A Sepharose FF, número de catálogo: 17-1279-01, fabricado por Amersham Pharmacia). Las condiciones de purificación son como sigue. La purificación por afinidad se llevó a cabo usando tampón PBS (-) con la siguiente composición como un tampón de adsorción y 0.1 M de tampón de citrato de sodio (pH 3) como tampón de elución de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. Se añadió 1 M de Tris-HCl (pH 8.0) a las fracciones eluidas para ajustar el pH a alrededor de 7.2. Las DO en 450 a 620 nm se midieron y después se seleccionaron los pocillos que muestran reacción positiva. Con referencia a la concentración de anticuerpos purificados, la absorbancia a 280 nm se determinó y calculó basado en 1.38 DO/mg /ml. Las relaciones entre los anticuerpos quiméricos ILT7 obtenidos, hibridomas a partir de los que se derivó el gen de la región variable, y las células huésped se resumieron en la Tabla 7.

Tampón PBS (-):

0.2 g/l Dihidrógeno fosfato monopotásico

0.2 g/l Cloruro potásico

8 g/l Cloruro sódico

1.15g/l Fosfato monoácido disódico anhidro

[Tabla 7]

Anticuerpos quiméricos producidos			
Nombres de los anticuerpos quiméricos producidos	Hibridomas usados	Forma de transformación.	Células introducidas
Anticuerpo quimérico #11 ILT7	#11	Forma transitoria	293T
Anticuerpo quimérico #17 ILT7	#17		
Anticuerpo quimérico #11-5 ILT7	#11	Homeostasis	YB 2/0
Anticuerpo quimérico #11-16 ILT7	#11		
Anticuerpo quimérico #17-24 ILT7	#17		

Las secuencias de bases de ADNc y secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos quiméricos producidos se muestran más abajo, respectivamente. En cada secuencia de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal a -1 es una secuencia señal y la secuencia de aminoácidos de 1 a C terminal es una secuencia de aminoácidos de una proteína madura. Esto es, las cadenas pesada y ligera, que constituyen estos anticuerpos quiméricos, consisten de la secuencia de aminoácidos a partir de 1 a C terminal de cada una de las siguientes secuencias de aminoácidos.

	Cadena pesada	Cadena ligera
#11	Sec. con núm. ident.: 50 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 52 (secuencia base)
	Sec. con núm. ident.: 51 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 53 (secuencia de aminoácidos)
#17	Sec. con núm. ident.: 54 (secuencia base)	Sec. con núm. ident.: 56 (secuencia base)
	Sec. con núm. ident.: 55 (secuencia de aminoácidos)	Sec. con núm. ident.: 57 (secuencia de aminoácidos)

Aplicabilidad industrial

La presente divulgación proporciona el inmunógeno útil para producir el anticuerpo que reconoce específicamente ILT7 humano y el método para producir anticuerpo anti-ILT7 usando el inmunógeno. El anticuerpo que reconoce específicamente ILT7 humano para su uso en la presente invención reconoce específicamente ILT7 en la presencia de la familia ILT. Por lo tanto, el anticuerpo para su uso en la presente invención puede usarse para la detección y el aislamiento de ILT7 humana.

Por ejemplo, la localización de ILT7 puede analizarse además usando el anticuerpo de la presente divulgación. Se considera que ILT7 es una molécula estrechamente relacionada con la diferenciación y función de las IPC o células dendríticas. Por lo tanto, el anticuerpo, que reconoce ILT7 con alta especificidad, es útil para el análisis de la función de las IPC o células dendríticas. Las células cancerosas de tipo IPC (que tienen la característica en la que se expresa BDCA-2) se conocen (Chaper of L y otro. Eur. J. Immunol. 34; 418-426, 2004, Maeda T y otros, Int. J. Hematol. 81; 148-154, 2005). La confirmación de la expresión de ILT7 en estas células puede permitir el diagnóstico de cáncer y un agente terapéutico.

Se indica, en el caso de las enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la profunda relación entre $IFN\alpha$, producido por las IPC y el desarrollo de la psoriasis, que es una enfermedad de la piel (Nestle FO y otros, J. Exp. Med. 202, 135-143, 2005). Por lo tanto, la gravedad de la psoriasis puede examinarse identificando las IPC en el tejido de la piel de pacientes con psoriasis, es decir, en las muestras de biopsia usando el anticuerpo anti-ILT7.

Se sabe que el desarrollo del SIDA en pacientes infectados por el VIH se correlaciona con el número de las IPC. Es decir, muchas de las IPC se han observado en pacientes que no presentan síntomas y la reducción en las IPC se observó en el inicio (Soumells V. y otros, Blood 98; 906-912, 2001). Por lo tanto, es eficaz en la predicción del pronóstico de la infección por el virus, como el VIH.

Por ejemplo, ILT7 es una molécula que se expresa específicamente en las IPC humanas. Por lo tanto, el anticuerpo anti-ILT7 para su uso en la presente invención puede usarse para detectar, identificar, o aislar las IPC. Las IPC son células que producen la mayoría del interferón de tipo 1. Por lo tanto, la detección, identificación, o aislamiento es un objetivo importante en el diagnóstico y estudio de las enfermedades que involucran el interferón tipo 1. Como tales enfermedades, se puede ilustrar diversas enfermedades autoinmunes e infecciones que el interferón se involucra en la formación de la condición patológica.

Además, el anticuerpo anti-ILT7 para su uso en la presente invención tiene el efecto inhibidor en la actividad de las IPC. Por lo tanto, la actividad de las IPC puede inhibirse mediante el uso del anticuerpo anti-ILT7 para su uso en la presente invención. Además, las enfermedades que involucran el interferón tipo 1 pueden tratarse mediante la inhibición de la actividad de las IPC. Específicamente, el anticuerpo anti-ILT7 para su uso la presente invención es útil para diversas enfermedades autoinmunes e infecciones que involucra el interferón en la formación de la afección patológica. Particularmente, ya que el anticuerpo anti-ILT7 tiene una alta especificidad, puede eliminar de manera eficiente las IPC.

Lista de secuencias

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

<120> Anticuerpo anti-ILT7

<130> G2-A0501P

<150> JP 2005-366465

<151> 2005-12-20

<160> 76

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1577

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (24).. (1520)

<220>

<221> péptido_señal

<222> (24).. (71)

<220>

<221> péptido_mad

<222> (72).. (1520)

<400> 1

cagggccagg aggaggagat gcc atg acc ctc att ctc aca agc ctg ctc ttc 53
Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe

5

-15	-10	
ttt ggg ctg agc ctg ggc ccc agg acc cgg gtg cag gca gaa aac cta	101	
Phe Gly Leu Ser Leu Gly Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu		
-5 -1 1 5 10		
ccc aaa ccc atc ctg tgg gcc gag cca ggt ccc gtg atc acc tgg cat	149	
Pro Lys Pro Ile Leu Trp Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His		
15 20 25		
aac ccc gtg acc atc tgg tgt cag ggc acc ctg gag gcc cag ggg tac	197	
Asn Pro Val Thr Ile Trp Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr		
30 35 40		
cgt ctg gat aaa gag gga aac tca atg tcg agg cac ata tta aaa aca	245	
Arg Leu Asp Lys Glu Gly Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr		
45 50 55		
ctg gag tct gaa aac aag gtc aaa ctc tcc atc cca tcc atg atg tgg	293	
Leu Glu Ser Glu Asn Lys Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp		
60 65 70		
gaa cat gca ggg cga tat cac tgt tac tat cag agc cct gca gcc tgg	341	
Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp		
75 80 85 90		
tca gag ccc agc gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gcc tac agc aga	389	
Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg		
95 100 105		
ccc acc ctg tcc gca ctg cca agc cct gtg gtg acc tca gga gtg aac	437	
Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Val Asn		
110 115 120		
gtg acc ctc cgg tgt gcc tca cgg ctg gga ctg gcc agg ttc act ctg	485	
Val Thr Leu Arg Cys Ala Ser Arg Leu Gly Leu Gly Arg Phe Thr Leu		

125	130	135	
att gag gaa gga gac cac agg ctc tcc tgg acc ctg aac tca cac caa			533
Ile Glu Glu Gly Asp His Arg Leu Ser Trp Thr Leu Asn Ser His Gln			
140	145	150	
cac aac cat gga aag ttc cag gcc ctg ttc ccc atg ggc ccc ctg acc			581
His Asn His Gly Lys Phe Gln Ala Leu Phe Pro Met Gly Pro Leu Thr			
155	160	165	170
ttc agc aac agg ggt aca ttc aga tgc tac ggc tat gaa aac aac acc			629
Phe Ser Asn Arg Gly Thr Phe Arg Cys Tyr Gly Tyr Glu Asn Asn Thr			
175	180	185	
cca tac gtg tgg tog gaa ccc agt gac ccc ctg cag cta ctg gtg tca			677
Pro Tyr Val Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro Leu Gln Leu Leu Val Ser			
190	195	200	
ggc gtg tct agg aag ccc tcc ctc ctg acc ctg cag ggc cct gtc gtg			725
Gly Val Ser Arg Lys Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Val			
205	210	215	
acc ccc gga gag aat ctg acc ctc cag tgt ggc tct gat gtc ggc tac			773
Thr Pro Gly Glu Asn Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr			
220	225	230	
atc aga tac act ctg tac aag gag ggg gcc gat ggc ctc ccc cag cgc			821
Ile Arg Tyr Thr Leu Tyr Lys Glu Gly Ala Asp Gly Leu Pro Gln Arg			
235	240	245	250
cct ggc cgg cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg			869
Pro Gly Arg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu			
255	260	265	
agc cct gtg agc cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggc gca			917
Ser Pro Val Ser Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala			

270	275	280	
cac aac gtc tcc tcc gag tgg tgg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc			965
His Asn Val Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile			
285	290	295	
ctg atc gca gga cag atc tct gac aga ccc tcc ctc tca gtg cag ccg			1013
Leu Ile Ala Gly Gln Ile Ser Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro			
300	305	310	
ggc ccc acg gtg acc tca gga gag aag gtg acc ctg ctg tgt cag tca			1061
Gly Pro Thr Val Thr Ser Gly Glu Lys Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser			
315	320	325	330
tgg gac ccg atg ttc act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gcc cat			1109
Trp Asp Pro Met Phe Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His			
335	340	345	
ccc ccg ttg cgt ctg aga tca atg tac gga gct cat aag tac cag gct			1157
Pro Pro Leu Arg Leu Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala			
350	355	360	
gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc tac agg			1205
Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg			
365	370	375	
tgc tac ggc tca cgc agc tcc aac ccc tac ctg ctg tct cac ccc agt			1253
Cys Tyr Gly Ser Arg Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser			
380	385	390	
gag ccc ctg gag ctc gtg gtc tca gga gca act gag acc ctc aat cca			1301
Glu Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Gly Ala Thr Glu Thr Leu Asn Pro			
395	400	405	410
gca caa aag aag tca gat tcc aag act gcc cca cac ctc cag gat tac			1349
Ala Gln Lys Lys Ser Asp Ser Lys Thr Ala Pro His Leu Gln Asp Tyr			

	415	420	425	
	aca gtg gag aat ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg ctg			1397
	Thr Val Glu Asn Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Leu			
	430	435	440	
	ttc ctc ggg att ctg tta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc ccc			1445
	Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Pro			
	445	450	455	
	cca agg tgc agc cag gag gca aac agc aga aag gac aat gca ccc ttc			1493
	Pro Arg Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe			
	460	465	470	
	aga gtg gtg gag cct tgg gaa cag atc tgatgatctg aggaggttct			1540
	Arg Val Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile			
	475	480		
	ggaagactgg ggcagcagtt ggggaagtgt ctgctga			1577
	<210> 2			
	<211> 499			
5	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 2			
	Met Thr Leu Ile Leu Thr Ser Leu Leu Phe Phe Gly Leu Ser Leu Gly			
	-15	-10	-5	-1
	Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Glu Asn Leu Pro Lys Pro Ile Leu Trp			
10	1	5	10	15

Ala Glu Pro Gly Pro Val Ile Thr Trp His Asn Pro Val Thr Ile Trp
20 25 30

Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Gln Gly Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly
35 40 45

Asn Ser Met Ser Arg His Ile Leu Lys Thr Leu Glu Ser Glu Asn Lys
50 55 60

Val Lys Leu Ser Ile Pro Ser Met Met Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr
65 70 75 80

His Cys Tyr Tyr Gln Ser Pro Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
85 90 95

Leu Glu Leu Val Val Thr Ala Tyr Ser Arg Pro Thr Leu Ser Ala Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu Val
385 390 395 400

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

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

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

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

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

Glu Gln Ile

5 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

15 <400> 3
ctccaacccc tacctgctgt c 21

20 <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

30 <400> 4
ttccaaggc tccaccactc t 21

35 <210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

45 <400> 5
cctcaatcca gcacaaaaga agt 23

40 <210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

45 <400> 6
cggatgagat tctccactgt gtaa 24

<210> 7
<211> 18
<212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	
	<400> 7	
	ccacccatgg caaattcc	18
	<210> 8	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	
	<400> 8	
	tgggattcc attgatgaca ag	22
20	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	
	<400> 9	
30	agggccagg aggaggagat g	21
	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	
	<400> 10	
40	tcagcagaca cttccccaac t	21
	<210> 11	
	<211> 105	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	
50	<400> 11	
	ccgctcgaga tgaccctcat tctcacaagc ctgctcttct ttgggctgag cctgggcgat	60
	tacaaggatg acgacgataa gcccaggacc cgggtgcagg cagaa	105
	<210> 12	
	<211> 31	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada	

<400> 12
ctagactagt tcagatctgt tcccaaggct c 31

5 <210> 13
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

<400> 13
ccgctcgaga tgaccctcat ttcacaagc 30

15 <210> 14
<211> 55
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

<400> 14
25 ctagactagt tcactatcg tcgtcatcct tgtaatcgat ctgtcccaa ggctc 55

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

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

35 <400> 15

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

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

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

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

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

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

tattttttt tggcttctgg ttcttc 313

<210> 16
<211> 86
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu
20 25 30

Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile
35 40 45

10 Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val
50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln
85

5 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
 10 <400> 17
 cccaagatga ttccagcagt g 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
 20 <400> 18
 ggaagaacca gaagccaaag a 21
 <210> 19
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
 30 <400> 19
 ccgctcgaga tgattccagc agtggctctg 30
 <210> 20
 <211> 61
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
 <400> 20
 ctagactagt ctacagatcc tcttcagaga tgagtttctg ctctgtggt ggtttctcat 60
 g 61
 45 <210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> una secuencia peptídica artificialmente sintetizada
 55 <400> 21
 Cys Ser Gln Glu Ala Asn Ser Arg Lys Asp Asn Ala Pro Phe Arg Val

1	5	10	15
Val Glu Pro Trp Glu Gln Ile			
20			
<210> 22			
<211> 31			
<212> ADN			
5	<213> Artificial		
<220>			
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada			
10	<400> 22		
	ccgctcgaga tgaccccat cctcacggtc c	31	
<210> 23			
<211> 55			
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
<220>			
<223> una secuencia cebadora artificialmente sintetizada			
20	<400> 23		
	ctagactagt tcacttatcg tcgtcatcct tgtaatccct cccggctgca tcttg	55	
<210> 24			
25	<211> 1425		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
<220>			
30	<221> CDS		
	<222> (1).. (1425)		
	<400> 24		

atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc	48
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ccc agg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg	96
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp	
20 25 30	
gct gag cca ggc tct gtg atc atc cag gga agt cct gtg acc ctc agg	144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg	
35 40 45	
tgt cag ggg agc ctt cag gct gag gag tac cat cta tat agg gaa aac	192
Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn	
50 55 60	
aaa tca gca tcc tgg gtt aga cgg ata caa gag cct ggg aag aat ggc	240
Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly	
65 70 75 80	
cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cac gca ggg cgg tat cac	288
Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His	
85 90 95	
tgt cag tac tac agc cac aat cac tca tca gag tac agt gac ccc ctg	336
Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu	
100 105 110	
gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac agc aaa ccc acc ctc tca gct ctg	384
Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu	

115	120	125	
ccc agc cct gtg gtg acc tta gga ggg aac gtg acc ctc cag tgt gtc			432
Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val			
130	135	140	
tca cag gtg gca ttt gac ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga gaa gat			480
Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp			
145	150	155	160
gaa cac cca caa cgc ctg aac tcc cat tcc cat gcc cgt ggg tgg tcc			528
Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser			
165	170	175	
tgg gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg tgg tcg			576
Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser			
180	185	190	
tac agg tgc tat gct tat gac tcg aac tct ccc tat gtg tgg tct cta			624
Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu			
195	200	205	
ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag aag cca			672
Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro			
210	215	220	
tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atg gtg gcc cct ggg gag agc ctg			720
Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu			
225	230	235	240
acc ctc cag tgt gtc tct gat gtc ggc tac gac aga ttt gtt ctg tat			768
Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr			
245	250	255	
aag gag gga gaa cgt gac ttc ctc cag cgc cct ggt tgg cag ccc cag			816
Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln			

260	265	270	
gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc ccc tcc			864
Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser			
275	280	285	
cac ggg ggc cag tac aga tgc tac agt gca cac aac ctc tcc tcc gag			912
His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu			
290	295	300	
tgg tgg gcc ccc agt gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga cag ttc			960
Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe			
305	310	315	320
tat gac aga ccc tct ctc tgg gtg cag cgg gtc ccc aca gta gcc cca			1008
Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro			
325	330	335	
gga aag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cgg ggg cag ttc cac act			1056
Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr			
340	345	350	
ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca ggc cat ccc cca ctg cat ctg aga			1104
Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg			
355	360	365	
tca gag cac caa gct cag cag aac cag gct gaa ttc cgc atg ggt cct			1152
Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro			
370	375	380	
gtg acc tca gcc cac gtg ggg acc tac aga tgc tac agc tca ctc agc			1200
Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser			
385	390	395	400
tcc aac ccc tac ctg ctg tct ctc ccc agt gac ccc ctg gag ctc gtg			1248
Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val			

	405	410	415	
gtc tca gca tcc cta ggc caa cac ccc cag gat tac aca gtg gag aat				1296
Val Ser Ala Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn				
	420	425	430	
ctc atc cgc atg ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg gtg gtc ctc ggg att				1344
Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly Ile				
	435	440	445	
ctg cta ttt gag gct cag cac agc cag aga agc cta caa gat gca gcc				1392
Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala				
	450	455	460	
ggg agg gat tac aag gat gac gac gat aag tga				1425
Gly Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys				
	465	470		

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

<400> 25

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn
50 55 60

Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly
65 70 75 80

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

Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu
100 105 110

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

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

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

Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser
165 170 175

Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser
180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu
195 200 205

Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro
210 215 220

Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu
225 230 235 240

Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr
245 250 255

Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln
260 265 270

Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser
275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1953)
<400> 26

atg acc ccc atc ctc acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc	48
Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ccc cgg acc cac gtg cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg	96
Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp	
20 25 30	
gct gaa cca ggc tot gtg atc acc cag ggg agt cct gtg acc ctc agg	144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg	
35 40 45	
tgt cag ggg ggc cag gag acc cag gag tac cgt cta tat aga gaa aag	192
Cys Gln Gly Gly Gln Glu Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys	
50 55 60	
aaa aca gca ccc tgg att aca cgg atc cca cag gag ctt gtg aag aag	240
Lys Thr Ala Pro Trp Ile Thr Arg Ile Pro Gln Glu Leu Val Lys Lys	
65 70 75 80	
ggc cag ttc ccc atc cca tcc atc acc tgg gaa cat gca ggg cgg tat	288
Gly Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr	
85 90 95	

cgc tgt tac tat ggt agc gac act gca ggc cgc tca gag agc agt gac	336
Arg Cys Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Ala Gly Arg Ser Glu Ser Ser Asp	
100 105 110	
ccc ctg gag ctg gtg gtg aca gga gcc tac atc aaa ccc acc ctc tca	384
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ile Lys Pro Thr Leu Ser	
115 120 125	
gcc cag ccc agc ccc gtg gtg aac tca gga ggg aat gta acc ctc cag	432
Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Asn Ser Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln	
130 135 140	
tgt gac tca cag gtg gca ttt gat ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga	480
Cys Asp Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly	
145 150 155 160	
gaa gat gaa cac cca caa tgc ctg aac tcc cag ccc cat gcc cgt ggg	528
Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly	
165 170 175	
tgc tcc cgc gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg	576
Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg	
180 185 190	
tgg tgg tac agg tgc tat gct tat gac tgc aac tct ccc tat gag tgg	624
Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp	
195 200 205	
tct cta ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cta ggt gtt tct aag	672
Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys	
210 215 220	
aag cca tca ctc tca gtg cag cca ggt cct atc gtg gcc cct gag gag	720
Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu	
225 230 235 240	

acc ctg act ctg cag tgt ggc tct gat gct ggc tac aac aga ttt gtt	768
Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val	
245 250 255	
ctg tat aag gac ggg gaa cgt gac ttc ctt cag ctc gct ggc gca cag	816
Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln	
260 265 270	
ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc	864
Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser	
275 280 285	
cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggt gca cac aac ctc tcc	912
Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser	
290 295 300	
tcc gag tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg gac atc ctg atc gca gga	960
Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly	
305 310 315 320	
cag ttc tat gac aga gtc tcc ctc tcg gtg cag ccg ggc ccc acg gtg	1008
Gln Phe Tyr Asp Arg Val Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val	
325 330 335	
gcc tca gga gag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca cag gga tgg atg	1056
Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met	
340 345 350	
caa act ttc ctt ctg acc aag gag ggg gca gct gat gac cca tgg cgt	1104
Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg	
355 360 365	
cta aga tca acg tac caa tct caa aaa tac cag gct gaa ttc ccc atg	1152
Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met	
370 375 380	

ggc cct gtc acc tca gcc cat gcg ggg acc tac agg tgc tac ggc tca	1200
Gly Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser	
385 390 395 400	
cag agc tcc aaa ccc tac ctg ctg act cac ccc agt gac ccc ctg gag	1248
Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu	
405 410 415	
ctc gtg gtc tca gga cgg tot ggg ggc ccc agc tcc ccg aca aca ggc	1296
Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly	
420 425 430	
ccc acc tcc aca tct ggc cct gag gac cag ccc ctc acc ccc acc ggc	1344
Pro Thr Ser Thr Ser Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly	
435 440 445	
tgc gat ccc cag agt ggt ctg gga agg cac ctg ggg gtt gtg atc ggc	1392
Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly	
450 455 460	
atc ttg gtg gcc gtc atc cta ctg ctc ctc ctc ctc ctc ctc ttc	1440
Ile Leu Val Ala Val Ile Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe	
465 470 475 480	
ctc atc ctc cga cat cga cgt cag ggc aaa cac tgg aca tcg acc cag	1488
Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln	
485 490 495	
aga aag gct gat ttc caa cat cct gca ggg gct gtg ggg cca gag ccc	1536
Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro	
500 505 510	
aca gac aga ggc ctg cag tgg agg tcc agc cca gct gcc gat gcc cag	1584
Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln	
515 520 525	

gaa gaa aac ctc tat got gcc gtg aag cac aca cag cct gag gat ggg	1632
Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys His Thr Gln Pro Glu Asp Gly	
530 535 540	
gtg gag atg gac act cgg agc cca cac gat gaa gac ccc cag gca gtg	1680
Val Glu Met Asp Thr Arg Ser Pro His Asp Glu Asp Pro Gln Ala Val	
545 550 555 560	
acg tat gcc gag gtg aaa cac tcc aga cct agg aga gaa atg gcc tct	1728
Thr Tyr Ala Glu Val Lys His Ser Arg Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser	
565 570 575	
cct cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag	1776
Pro Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln	
580 585 590	
gcc gaa gag gac agg cag atg gac act gag gct gct gca tct gaa gcc	1824
Ala Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ala Ser Glu Ala	
595 600 605	
ccc cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg	1872
Pro Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg	
610 615 620	
aag gca act gag cct cct cca tcc cag gaa ggg ccc tct cca gct gtg	1920
Lys Ala Thr Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Pro Ser Pro Ala Val	
625 630 635 640	
ccc agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tag	1953
Pro Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His	
645 650	

<210> 27
 <211> 650
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly
165 170 175

Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg
180 185 190

Trp Trp Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Glu Trp
195 200 205

Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Leu Gly Val Ser Lys
210 215 220

Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Ile Val Ala Pro Glu Glu
225 230 235 240

Thr Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Ala Gly Tyr Asn Arg Phe Val
245 250 255

Leu Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Leu Ala Gly Ala Gln
260 265 270

Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser
275 280 285

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

Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Ala Gly
305 310 315 320

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

Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Gln Gly Trp Met
340 345 350

Gln Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Trp Arg
355 360 365

Leu Arg Ser Thr Tyr Gln Ser Gln Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met
370 375 380

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

Gln Ser Ser Lys Pro Tyr Leu Leu Thr His Pro Ser Asp Pro Leu Glu
405 410 415

Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Gly Gly Pro Ser Ser Pro Thr Thr Gly
420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1347)
<400> 28

atg atc ccc acc ttc acg gct ctg ctc tgc ctc ggg ctg agt ctg ggc	48
Met. Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
ccc agg acc gac atg cag gca ggg ccc ctc ccc aaa ccc acc ctc tgg	96
Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp	
20 25 30	
gct gag cca ggc tot gtg atc agc tgg ggg aac tot gtg acc atc tgg	144
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp	
35 40 45	
tgt cag ggg acc ctg gag gct cgg gag tac cgt ctg gat aaa gag gaa	192
Cys Gln Gly Thr Leu Glu Ala Arg Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Glu	
50 55 60	
agc cca gca ccc tgg gac aga cag aac cca ctg gag ccc aag aac aag	240
Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys	
65 70 75 80	
gcc aga ttc tcc atc cca tcc atg aca gag gac tat gca ggg aga tac	288
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr	
85 90 95	
cgc tgt tac tat cgc agc cct gta ggc tgg tca cag ccc agt gac ccc	336
Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro	
100 105 110	
ctg gag ctg gtg atg aca gga gcc tac agt aaa ccc acc ctt tca gcc	384
Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala	
115 120 125	
ctg ccg agt cct ctt gtg acc tca gga aag agc gtg acc ctg ctg tgt	432
Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys	
130 135 140	

cag tca cgg agc cca atg gac act ttc ctt ctg atc aag gag cgg gca	480
Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Ile Lys Glu Arg Ala	
145 150 155 160	
gcc cat ccc cta ctg cat ctg aga tca gag cac gga gct cag cag cac	528
Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His	
165 170 175	
cag gct gaa ttc ccc atg agt cct gtg acc tca gtg cac ggg ggg acc	576
Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr	
180 185 190	
tac agg tgc ttc agc tca cac ggc ttc tcc cac tac ctg ctg tca cac	624
Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His	
195 200 205	
ccc agt gac ccc ctg gag ctc ata gtc tca gga tcc ttg gag ggt ccc	672
Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro	
210 215 220	
agg ccc tca ccc aca agg tcc gtc tca aca gct gca ggc cct gag gac	720
Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp	
225 230 235 240	
cag ccc ctc atg cct aca ggg tca gtc ccc cac agt ggt ctg aga agg	768
Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg	
245 250 255	
cac tgg gag gta ctg atc ggg gtc ttg gtg gtc tcc atc ctg ctt ctc	816
His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu	
260 265 270	
tcc ctc ctc ctc ttc ctc ctc ctc caa cac tgg cgt cag gga aaa cac	864
Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His	
275 280 285	

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

ggg gcc tct cca gct gag ccc agt gtc tat gcc act ctg gcc atc cac 1344
 Gly Ala Ser Pro Ala Glu Pro Ser Val Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His
 435 440 445

taa 1347

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

<400> 29

Met Ile Pro Thr Phe Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Pro Arg Thr Asp Met Gln Ala Gly Pro Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp
 20 25 30

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Asn Ser Val Thr Ile Trp
 35 40 45

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

Ser Pro Ala Pro Trp Asp Arg Gln Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu Asp Tyr Ala Gly Arg Tyr
 85 90 95

Arg Cys Tyr Tyr Arg Ser Pro Val Gly Trp Ser Gln Pro Ser Asp Pro
100 105 110

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

Leu Pro Ser Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ser Val Thr Leu Leu Cys
130 135 140

Gln Ser Arg Ser Pro Met Asp Thr Phe Leu Leu Ile Lys Glu Arg Ala
145 150 155 160

Ala His Pro Leu Leu His Leu Arg Ser Glu His Gly Ala Gln Gln His
165 170 175

Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser Pro Val Thr Ser Val His Gly Gly Thr
180 185 190

Tyr Arg Cys Phe Ser Ser His Gly Phe Ser His Tyr Leu Leu Ser His
195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Ile Val Ser Gly Ser Leu Glu Gly Pro
210 215 220

Arg Pro Ser Pro Thr Arg Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Pro Glu Asp
225 230 235 240

Gln Pro Leu Met Pro Thr Gly Ser Val Pro His Ser Gly Leu Arg Arg
245 250 255

His Trp Glu Val Leu Ile Gly Val Leu Val Val Ser Ile Leu Leu Leu
260 265 270

Ser Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Gln His Trp Arg Gln Gly Lys His
275 280 285

Arg Thr Leu Ala Gln Arg Gln Ala Asp Phe Gln Arg Pro Pro Gly Ala
290 295 300

Ala Glu Pro Glu Pro Lys Asp Gly Gly Leu Gln Arg Arg Ser Ser Pro
305 310 315 320

Ala Ala Asp Val Gln Gly Glu Asn Phe Cys Ala Ala Val Lys Asn Thr
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
- 15 <400> 30
ccatagtcc attttacagt tacc 24
- 20 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
- 30 <400> 31
gggaccaagg gatagacaga 20
- 35 <210> 32
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada
- 45 <400> 32
tccagagttc caggtaagg tcac 24
- 50 <210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
- 55 <220>

<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

<400> 33
gccagtggat agaccgatgg 20

5 <210> 34
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (24).. (25)
<223> I

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (29) .. (30)
<223> I

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (34).. (35)
<223> I

30 <400> 34
ggccacgcgt cgactagtagt gggngggggn gggng 36

35 <210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

40 <400> 35
ggccacgcgt cgactagtagt 20

45 <210> 36
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

<400> 36
ttcactgcca tcaatcttcc actt 24

55 <210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Una secuencia cebadora artificialmente sintetizada

<400> 37
 gatggataca gttggtgcag c 21

 5 <210> 38
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (408)

 15 <220>
 <221> péptido_señal
 <222> (1).. (54)

 20 <220>
 <221> péptido_mad
 <222> (55) .. (408)
 <400> 38

atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc	48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile	
-15 -10 -5	
ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tgg gga cct ggc ctg gtg aaa cct	96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro	
-1 1 5 10	
tct cag tct ctg tcc ctc acc tgc act gtc act ggc tac tca atc acc	144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr	
15 20 25 30	
agt gat tat gcc tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg	192
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu	
35 40 45	
gag tgg atg ggc tac ata agc tac agt ggt agc act agc tac aac cca	240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro	
50 55 60	
tct ctc aaa agt cga atc tct atc act cga gac aca tcc aag aac cag	288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln	
65 70 75	
ttc ttc ctg cag ttg aat tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat	336
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr	
80 85 90	
tac tgt gca aga tct ccc cct tac tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105 110	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
115	

5 <210> 39
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

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

10 <220>
<221> CDS
<222> (1).. (381)
<220>
<221> péptido_señal
<222> (1).. (60)

15

<220>

<221> péptido mad

<222> (61) .. (381)

5 <400> 40

atg gag aca cat tct cag gtc ttt gta tac atg ttg ctg tgg ttg tct 48

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser

-20 -15 -10 -5

ggt gtt gaa gga gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc 96

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser

-1 1 5 10

aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat 144

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct 192

Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

30 35 40

aaa cta ctg att tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp

45 50 55 60

cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc 288

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

aat gtg cag tct gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc 336

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser

80 85 90

agc tat cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 381

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

95 100 105

10 <210> 41

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 414

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (414)

10

<220>

<221> péptido_señal

<222> (1) .. (57)

<220>

15

<221> péptido_mad

<222> (58) .. (414)

<400> 42 ..

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

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

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

acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt 192
Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45

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

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

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

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

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 414
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115

5

<210> 43

<211> 138

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<400> 43

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
-15 -10 -5

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

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

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
30 35 40 45

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

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
65 70 75

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val
80 85 90

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
95 100 105

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115

5

<210> 44
<211> 381
<212> ADN
<213> Mus musculus

10

<220>

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

 <220>
 5 <221> péptido_señal
 <222> (1).. (60)

 <220>
 10 <221> péptido_mad
 <222> (61).. (381)

 <400> 44

 atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48
 Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
 -20 -15 -10 -5

 gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96
 Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 -1 1 5 10

 gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144
 Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 15 20 25

 att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192
 Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
 30 35 40

 agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240
 Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45 50 55 60

 agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn
 65 70 75

 agt gtg gag act gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac 336
 Ser Val Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn
 80 85 90

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

<210> 45
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 46
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (408)
 <220>
 <221> péptido_senial
 <222> (1) .. (54)

20

<220>

<221> péptido_mad

<222> (55).. (408)

5

<400> 46

atg aga gtg ctg att ctt ttg tgg ctg ttc aca gcc ttt cct ggt atc 48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

-15 -10 -5

ctg tct gat gtg cag ctt cag gag tgg gga cct ggc ctg gtg aaa cct 96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro

-1 1 5 10

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

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

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

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

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

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

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

115

10

<210> 47

<211> 136

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

5

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 48

<211> 381

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10

15

<222> (1) .. (381)

<220>
 <221> péptido_señal
 5 <222> (1) .. (60)

<220>
 <221> péptido_mad
 10 <222> (61) .. (381)

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

agc tat cct tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 15 95 100 105

<210> 49
 <211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

5

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 50

<211> 1401

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos artificialmente sintetizada

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)..(1398)

<220>

<221> péptido_senial

<222> (1) .. (54)

<220>

<221> péptido_mad

<222> (55) .. (1398)

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tgg gtc 432
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

115	120	125	
ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc			480
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
130	135	140	
ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg			528
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	
tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc			576
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
160	165	170	
cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc			624
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
175	180	185	190
tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag			672
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
195	200	205	
ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac			720
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
210	215	220	
aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga			768
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc			816
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
240	245	250	
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa			864
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			

255	260	265	270	
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat				912
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
	275	280	285	
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt				960
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg				
	290	295	300	
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag				1008
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
	305	310	315	
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag				1056
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				
	320	325	330	
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac				1104
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
	335	340	345	350
acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg				1152
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
	355	360	365	
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg				1200
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
	370	375	380	
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg				1248
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
	385	390	395	
ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac				1296
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				

400 405 410

aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat 1344
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 415 420 425 430

gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg 1392
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

ggt aaa tga 1401
 Gly Lys

<210> 51
 <211> 466
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético
 10 <400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
335 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
400 405 410

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
415 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys

<210> 52

<211> 705

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos artificialmente sintetizada.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (702)

<220>

<221> péptido_senial

5 <222> (1) .. (60)

<220>

<221> péptido_mad

10 <222> (61) .. (702)

<400> 52

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

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

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

gtg ggt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct	192
---	-----

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

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

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
190 195 200

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgc tag 705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
205 210

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

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 54
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia de nucleótidos artificialmente sintetizada
 10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1404)
 15
 <220>
 <221> péptido_señal
 <222> (1) .. (57)
 20
 <220>
 <221> péptido_mad
 <222> (55).. (1404)
 <400> 54
 atg gga tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca ggt 48
 Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 -15 -10 -5

gtc cac tgc cag gtc cag ctg aag cag tct gga gct gag ctg gtg agg	96
Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg	
-1 1 5 10	
cct ggg gct tca gtg aag ctg tcc tgc aag act tct gga tac atc ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe	
15 20 25 30	
acc agc tac tgg att cac tgg gta aaa cag agg tct gga cag ggc ctt	192
Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu	
35 40 45	
gag tgg att gca agg att tat cct gga act ggt agt act tac tac aat	240
Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn	
50 55 60	
gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc	288
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
act gcc tac atg cag ctc agc agc ctg aaa tct gag gac tct gct gtc	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gca aga tac cct acc tac gac tgg tac ttc gat gtc tgg	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp	
95 100 105 110	
ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca	432
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	
115 120 125	
tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca	480
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	
130 135 140	

gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg 528
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155

gtg tgg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg 576
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
160 165 170

gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc 624
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
175 180 185 190

gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat 672
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct 720
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg 768
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235

ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc 816
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
240 245 250

atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc 864
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
255 260 265 270

cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag 912
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg	960
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	
290 295 300	
tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat	1008
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
305 310 315	
ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc	1056
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
320 325 330	
atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag	1104
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
335 340 345 350	
gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc	1152
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val	
355 360 365	
agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg	1200
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
370 375 380	
gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct	1248
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
385 390 395	
ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc	1296
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
400 405 410	
gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg	1344
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
415 420 425 430	

atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg 1392
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435

440

445

tct ccg ggt aaa tga

1407

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 55

<211> 468

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 55

Met Gly Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

-15

-10

-5

Val His Cys Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg

-1 1

5

10

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

15

20

25

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

30

35

40

45

Glu Trp Ile Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn

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

190 195 200 205

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

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
240 245 250

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
255 260 265

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
270 275 280 285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315

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

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

335

340

345

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
350 355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
400 405 410

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
415 420 425

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
430 435 440 445

Ser Pro Gly Lys

- 5 <210> 56
<211> 705
<212> ADN
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Una secuencia de nucleótidos artificialmente sintetizada
- 15 <220>
<221> péptido_ señal
<222> (1) .. (60)
<220>
20 <221> péptido_ mad
<222> (61) .. (702)

<400> 56

atg gtt ttc aca cct cag att ctt gga ctt atg ctt ttc tgg att tca 48
Met Val Phe Thr Pro Gln Ile Leu Gly Leu Met Leu Phe Trp Ile Ser
-20 -15 -10 -5

gcc tcc aga ggt gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct 96
Ala Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
-1 1 5 10

gtg act cca gga gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt 144
Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
15 20 25

att agc aac tac cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca 192
Ile Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro
30 35 40

agg ctt ctc atc aag tat gct tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc 240
Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
45 50 55 60

5

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

5 <210> 57
<211> 234

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (6)
 5 <223> CDR

 <400> 58
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

 10 1 5

 <210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (17)
 20 <223> CDR

 <400> 59

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

 <210> 60
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (9)
 35 <223> CDR

 <400> 60

 Ser Pro Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 40 1 5

 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (11)
 50 <223> CDR

 <400> 61

 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 55 <210> 62

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (7)
 <223> CDR
 10 <400> 62
 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5
 15 <210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR
 25 <400> 63
 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (5)
 35 <223> CDR
 <400> 64
 Ser Tyr Trp Ile His
 1 5
 40 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1)..(17)
 <223> CDR
 50 <400> 65
 Arg Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1).. (10)
 <223> CDR

<400> 66

Tyr Pro Thr Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val

15 **1 5 10**

<210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1).. (11)
 25 <223> CDR

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu His

30 **1 5 10**

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1).. (7)
 40 <223> CDR

<400> 68

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

45 **1 5**

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1).. (9)
 <223> CDR

55 <400> 69

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
1 5
<210> 70
<211> 6
5 <212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
10 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (1).. (6)
<223> CDR
<400> 70
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
15 1 5
<210> 71
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Mus musculus
<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
25 <222> (1).. (17)
<223> CDR
<400> 71
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
Arg
30 <210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
35 <220>
<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
<222> (1).. (9)
40 <223> CDR
<400> 72
Ala Leu Pro Leu Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5
45 <210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
50 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (11)
 <223> CDR
 5 <400> 73
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 15 <222> (1) .. (7)
 <223> CDR
 <400> 74
 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 20 1 5
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 30 <222> (1) .. (9)
 <223> CDR
 <400> 75
 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 35 1 5
 <210> 76
 <211> 4
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> una secuencia peptídica artificialmente sintetizada
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICAS_MISCELÁNEAS
 <222> (2).. (3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 76
 50 Tyr Xaa Xaa Leu
 1

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une a un ILT7 humano, no se une a ninguno de ILT1 humano, ILT2 humano e ILT3 humano y suprime la producción de interferón- α (IFN α) a partir de células que expresan el ILT7 o un fragmento que comprende su región de unión al antígeno, para su uso en terapia.
2. Un anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso en terapia es tratar una enfermedad autoinmune..
3. Un anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el uso en terapia es tratar lupus eritematoso sistémico (LES).
4. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la célula que expresa el ILT7 es una célula que produce interferón (IPC).
5. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula es CD123 positiva o BDCA-2 positiva.
6. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula es CD3 negativa, CD14 negativa, CD16 negativa, CD19 negativa, CD20 negativa y CD56 negativa.
7. El anticuerpo monoclonal para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo monoclonal comprende secuencias de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las siguientes i) a iii) como CDR1, CDR2 y CDR3 en la región variable de cadena pesada y en la región variable de cadena ligera:
 - i) CDR1 de una región variable de cadena pesada: SDYAWN (sec. con núm. de ident.: 58);
 CDR2 de una región variable de cadena pesada: YISYSGSTSYNPSLKSR (sec. con núm. de ident.: 59); y
 CDR3 de una región variable de cadena pesada: SPPYYAMDY (sec. con núm. de ident.: 60);
 CDR1 de región variable de cadena ligera: KASQDVGTAVA (sec. con núm. de ident.: 61);
 CDR2 de una región variable de cadena ligera: WASTRHT (sec. con núm. de ident.: 62); y
 CDR3 de una región variable de cadena ligera: QQYSSYPLT (sec. con núm. de ident.: 63);
 - ii) CDR1 de una región variable de cadena pesada: SYWIH (sec. con núm. de ident.: 64);
 CDR2 de una región variable de cadena pesada: RIYPGTGSTYYNEKFKG (sec. con núm. de ident.: 65);
 y CDR3 de una región variable de cadena pesada: YPTYDWYFDV (sec. con núm. de ident.: 66);
 CDR1 de una región variable de cadena ligera: RASQSSISNYLH (sec. con núm. de ident.: 67);
 CDR2 de una región variable de cadena ligera: YASQSSIS (sec. con núm. de ident.: 68);
 CDR3 de una región variable de cadena ligera: QQSNSWPLT (sec. con núm. de ident.: 69); o
 - iii) CDR1 de una región variable de cadena pesada: SDYAWN (sec. con núm. de ident.: 70);
 CDR2 de una región variable de cadena pesada: YISYSGSTSYNPSLKSR (sec. con núm. de ident.: 71);
 CDR3 de una región variable de cadena pesada: ALPLPWFA (sec. con núm. de ident.: 72);
 CDR1 de una región variable de cadena ligera: KASQDVGTAVA (sec. con núm. de ident.: 73);
 CDR2 de una región variable de cadena ligera: WASTRHT (sec. con núm. de ident.: 74); y
 CDR3 de una región variable de cadena ligera: QQYSSYPYT (sec. con núm. de ident.: 75).

8. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el fragmento que comprende su región de unión al antígeno es Fab, F(ab')₂, Fv de cadena sencilla o diacuerpo.

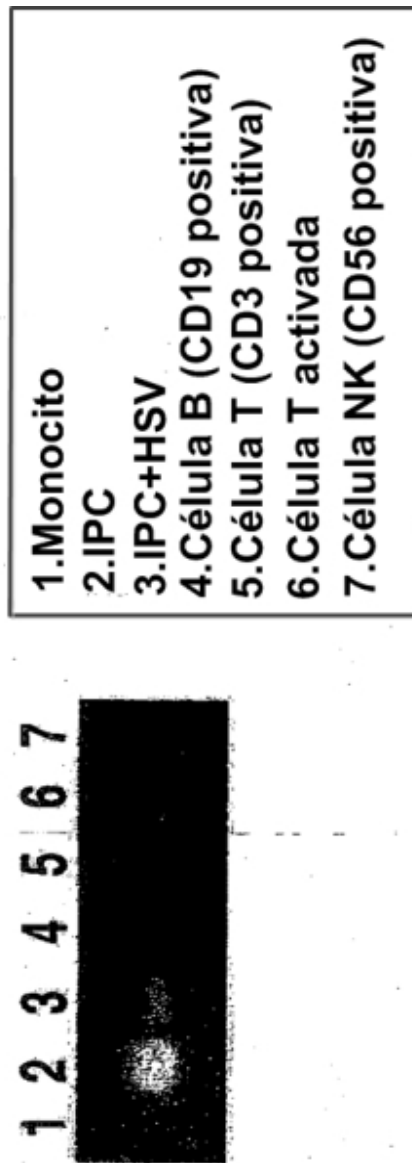


Figura 1a

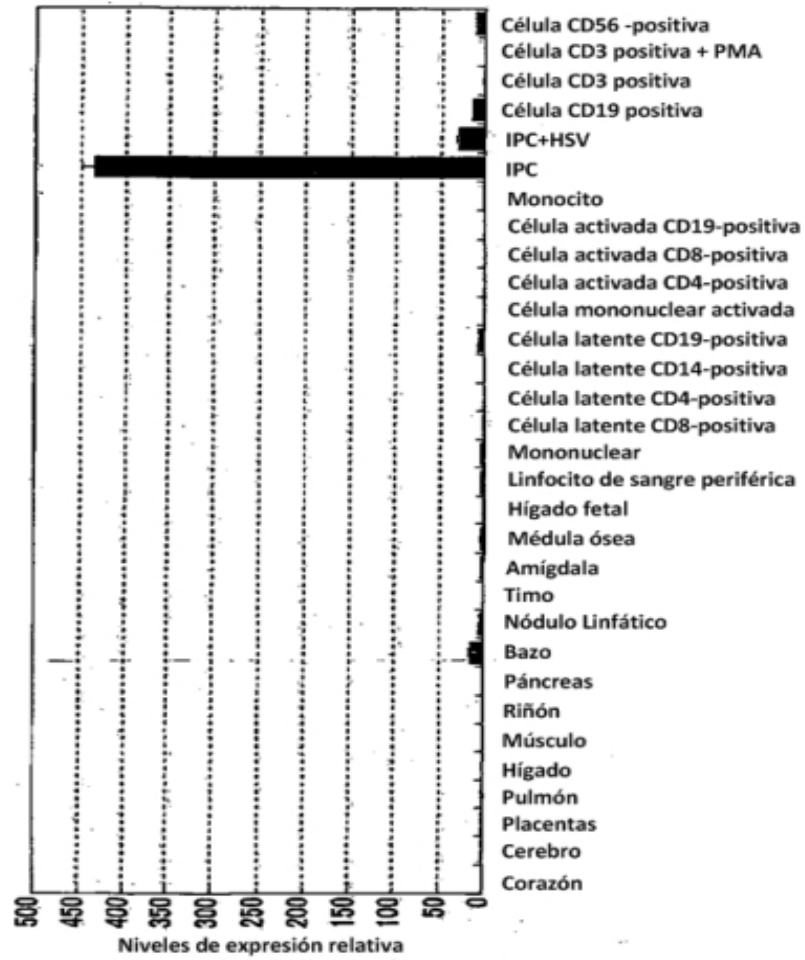


Figura 1b

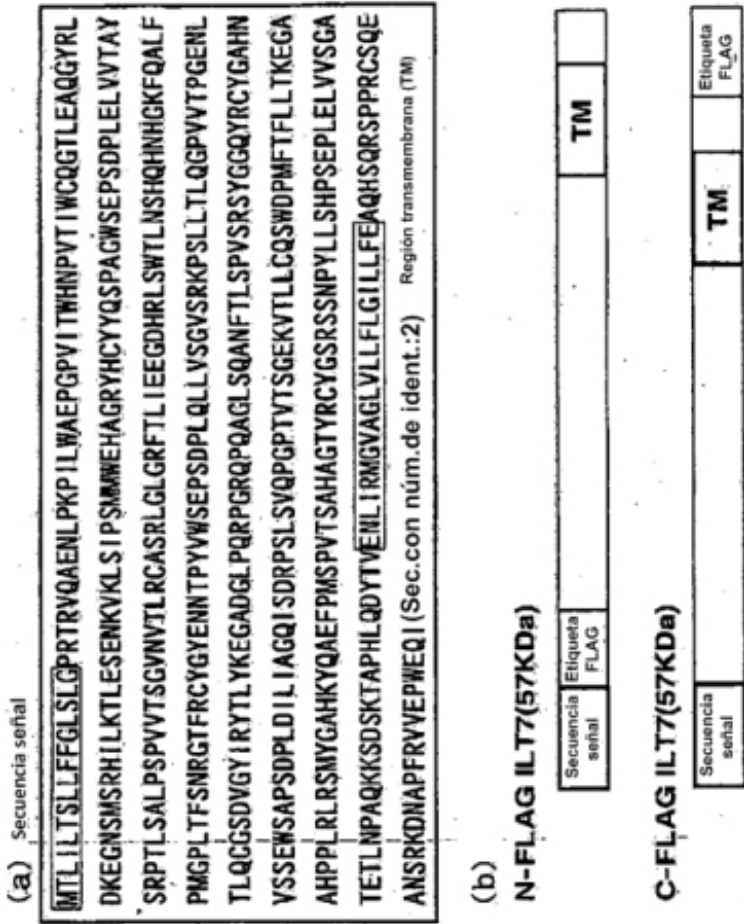


Figura 2

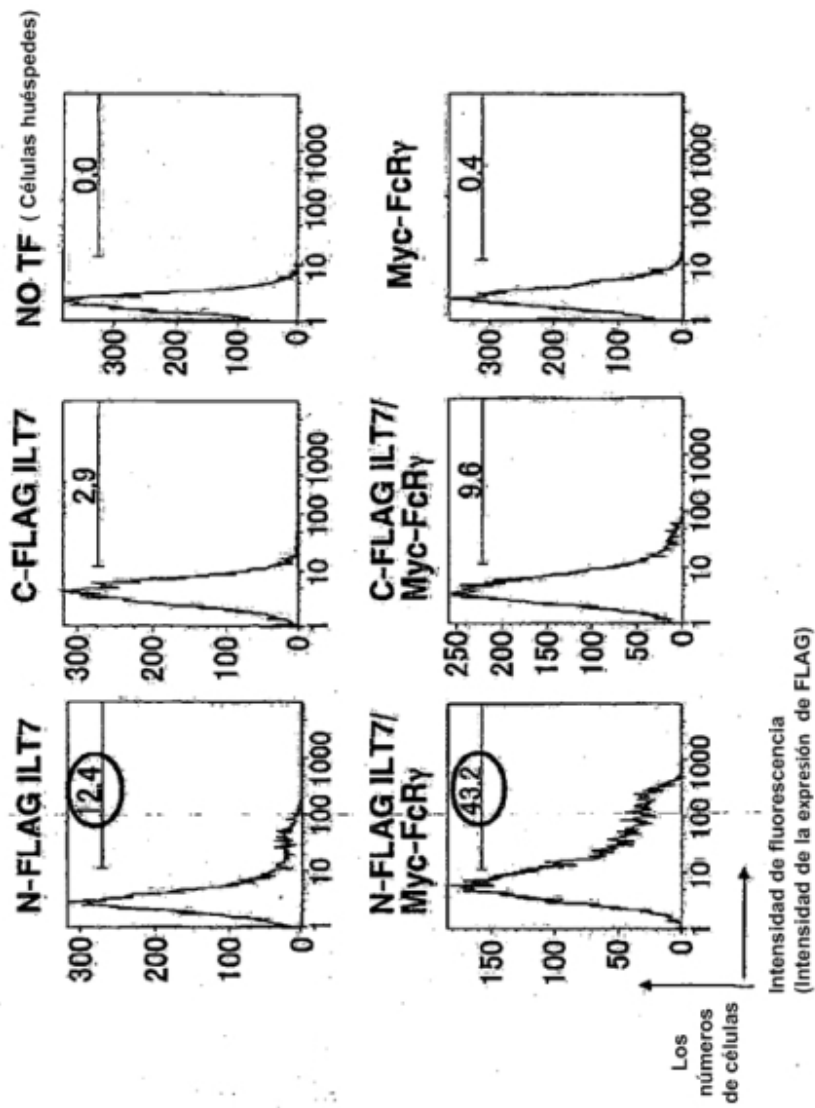


Figura 3

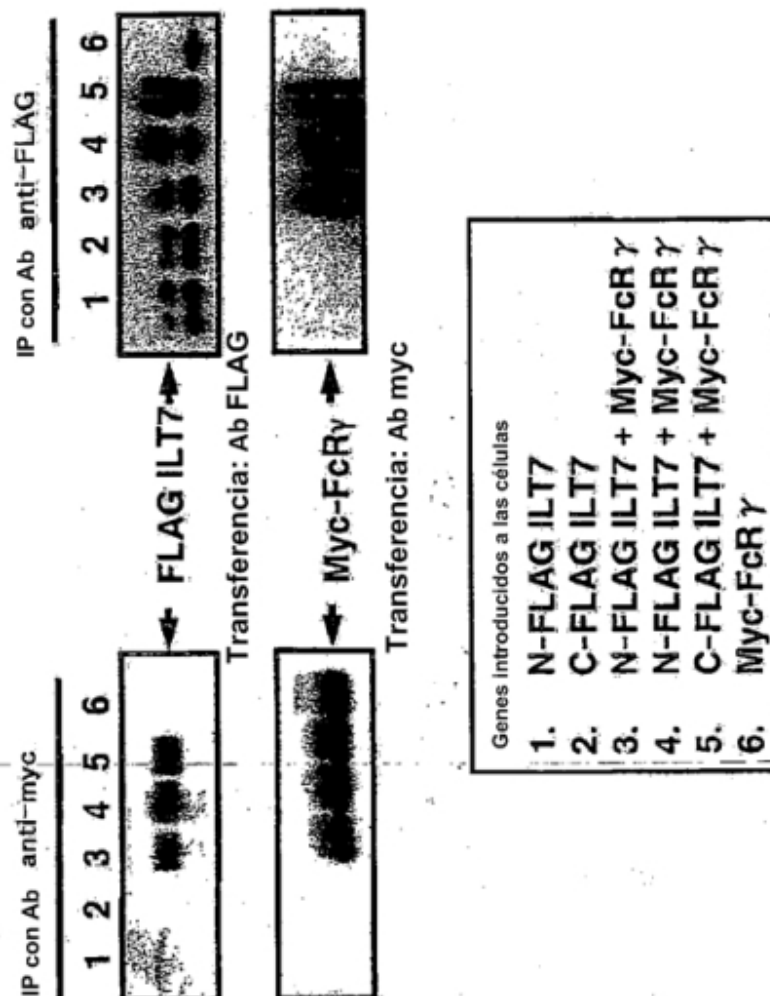


Figura 4

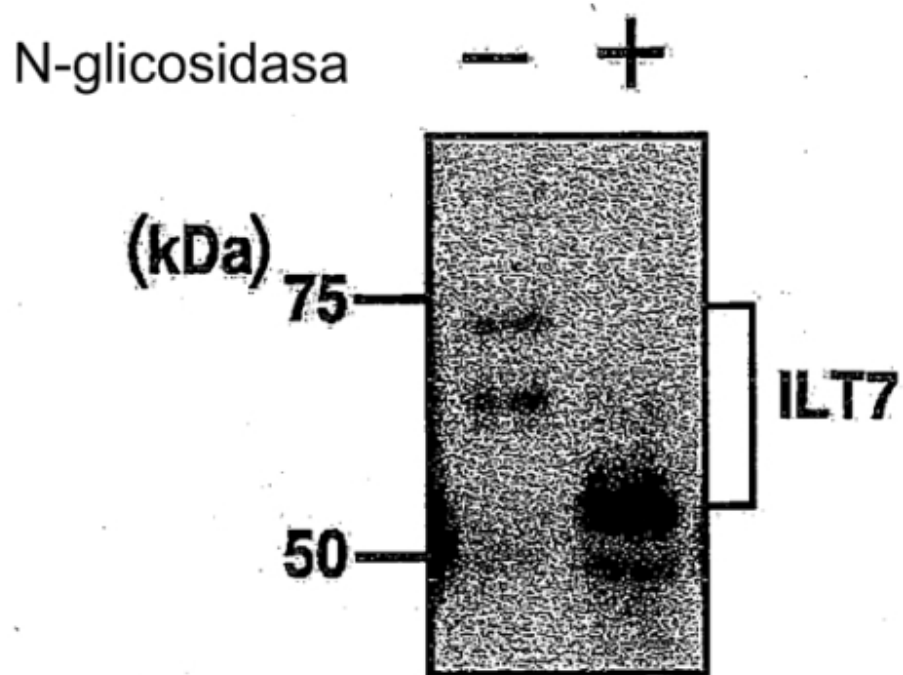


Figura 5

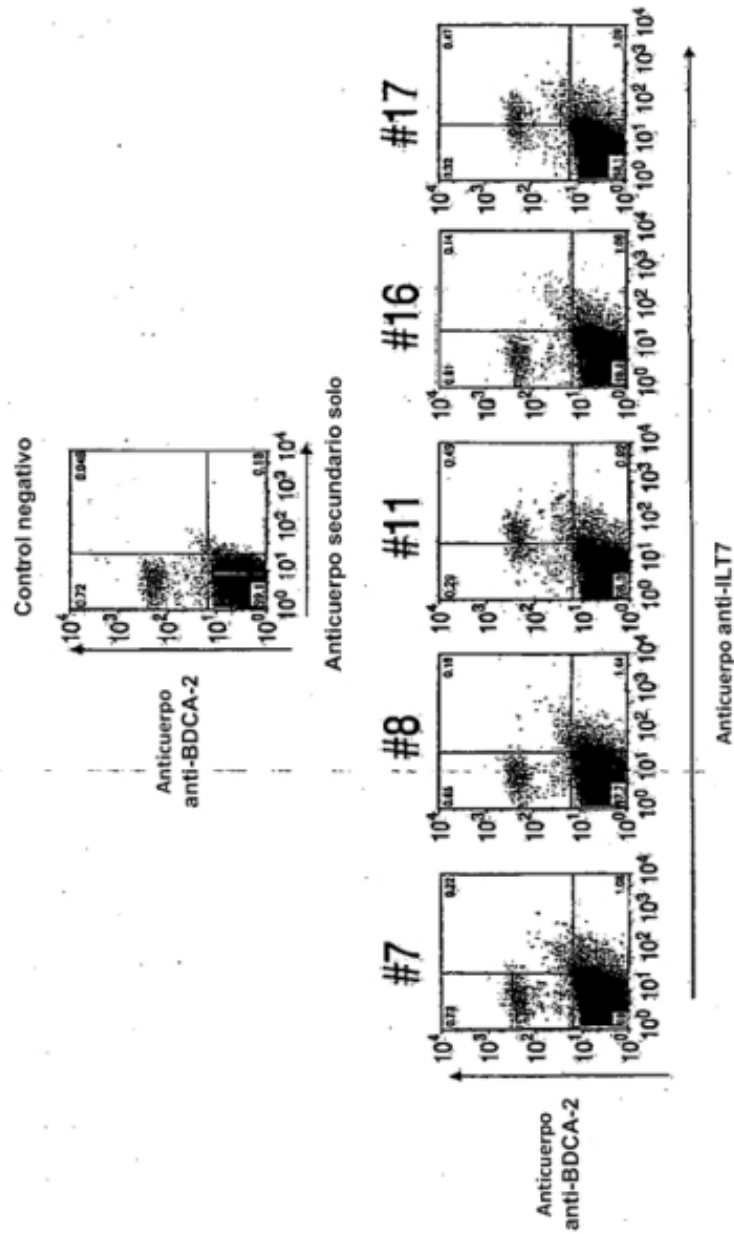


Figura 6a

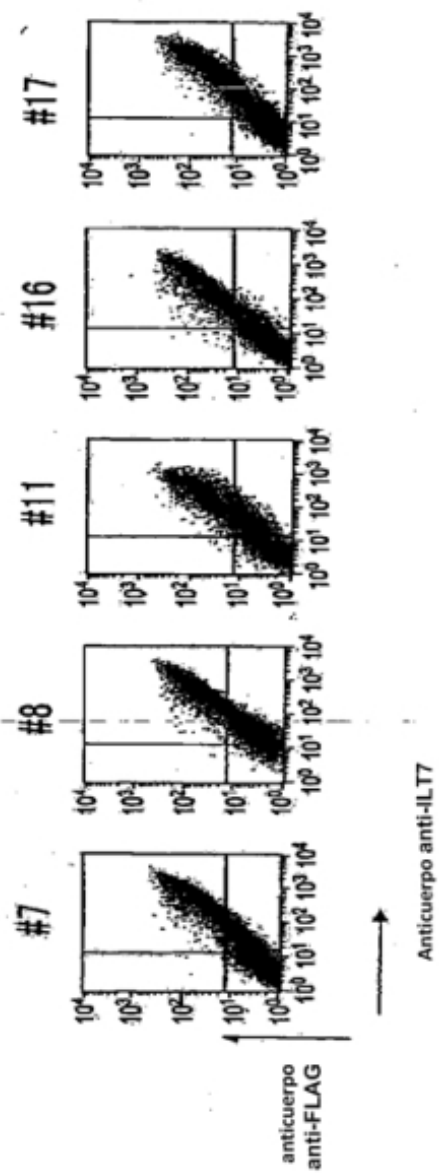


Figura 6b

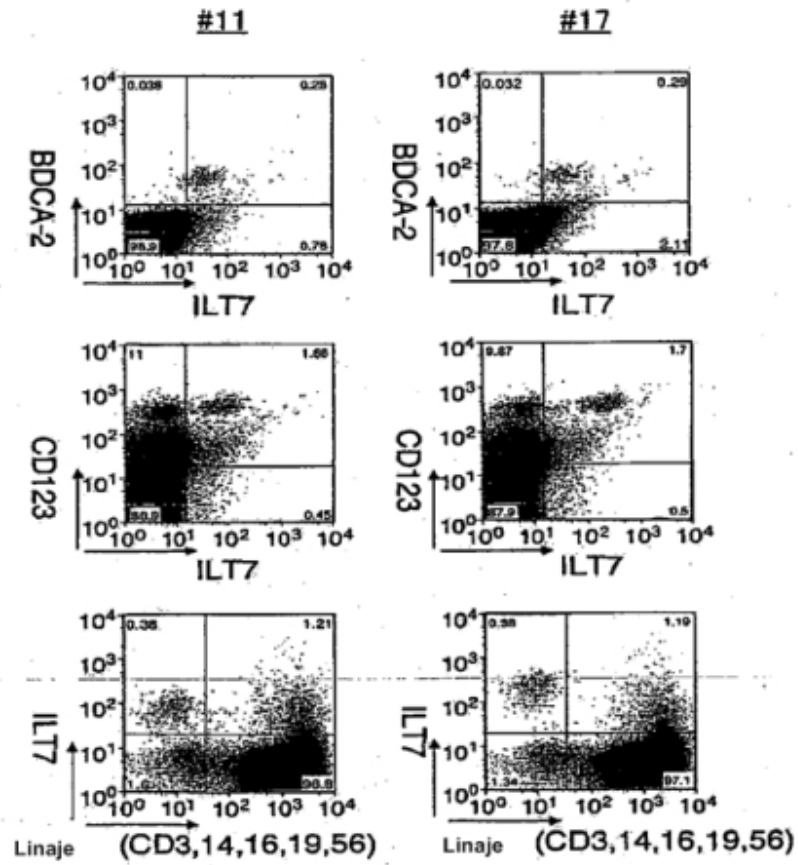


Figura 7

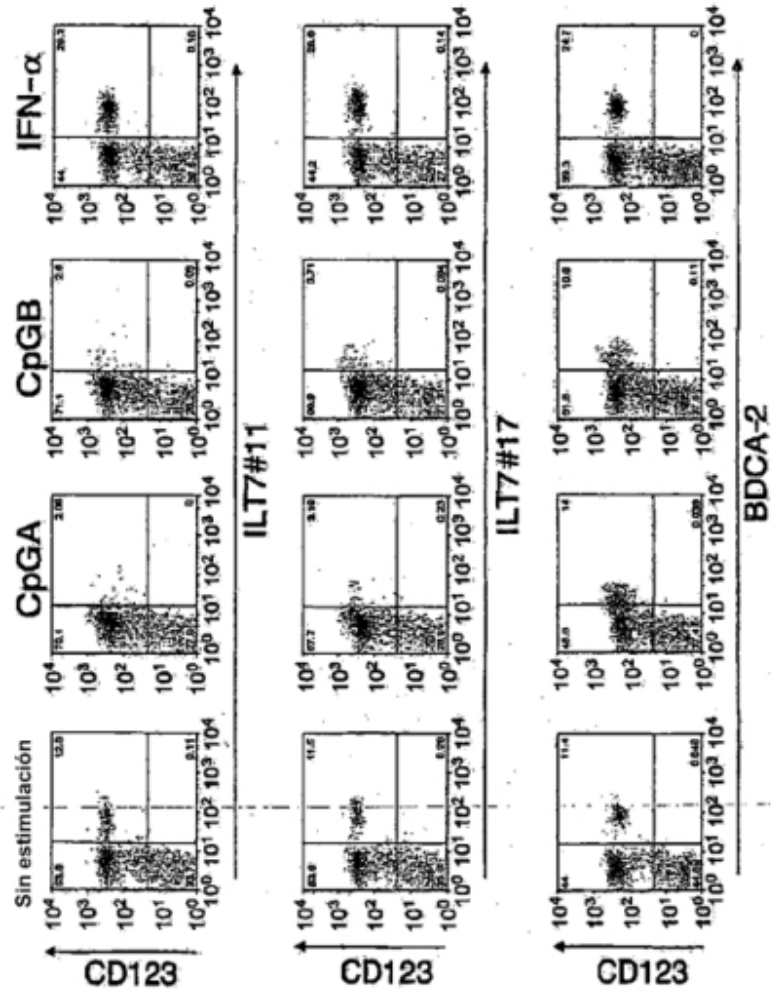


Figura 8

1L77 1MTILTSLLPFGLSLGPRTTRVQAEMLPKPILNARPOPTVTHNPPVTIWCQGTLEAQGYRL 60
 1L75 1MTPALTALLCLGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L78 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L76 1MTPIVTVLCLGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L71 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L76 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L72 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L74 1MTPIVTVLCLGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L78 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L73 1MTPILTALVLCGLSLGPRTTRVQAGPPKPTLNARPGSVISWSPVTIWCQGSLEAQGYRL 60
 1L77 61KEGNMSRHLKTLGSENVKLSIPSNMHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 118
 1L75 61DKEGSPPLDRNNPLEPKNKARFISIPSNMHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 119
 1L78 61DKEGSPPLDRNNPLEPKNKARFISIPSNMHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 119
 1L76 61YREKNTAPMITRIPQIVXKGOFFIPSIWHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 120
 1L71 61YREKNTAPMITRIPQIVXKGOFFIPSIWHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 120
 1L76 61YREKNTAPMITRIPQIVXKGOFFIPSIWHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 120
 1L72 61YREKNTAPMITRIPQIVXKGOFFIPSIWHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 120
 1L74 61YREKNTAPMITRIPQIVXKGOFFIPSIWHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 119
 1L78 61DKEGLPWARKRONPLEPKNKARFISIPSNMHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 119
 1L73 61DKEGLPWARKRONPLEPKNKARFISIPSNMHEHAGRYHCYTQSPAG-MSEPSDPLELVMTG 119
 1L77 119AXSRPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 178
 1L75 120YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 179
 1L78 120YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 179
 1L76 121YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 180
 1L71 119YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 180
 1L76 121YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 180
 1L72 121YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 180
 1L74 120YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 179
 1L78 120YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 178
 1L73 120YXNKPTLSALPSPVVTSGNVNLTLCASRLGLGRFLLIEGDHRLSWLNSHQHNGKFOA 178

Figura 9a

[illegible]

Figura 9c

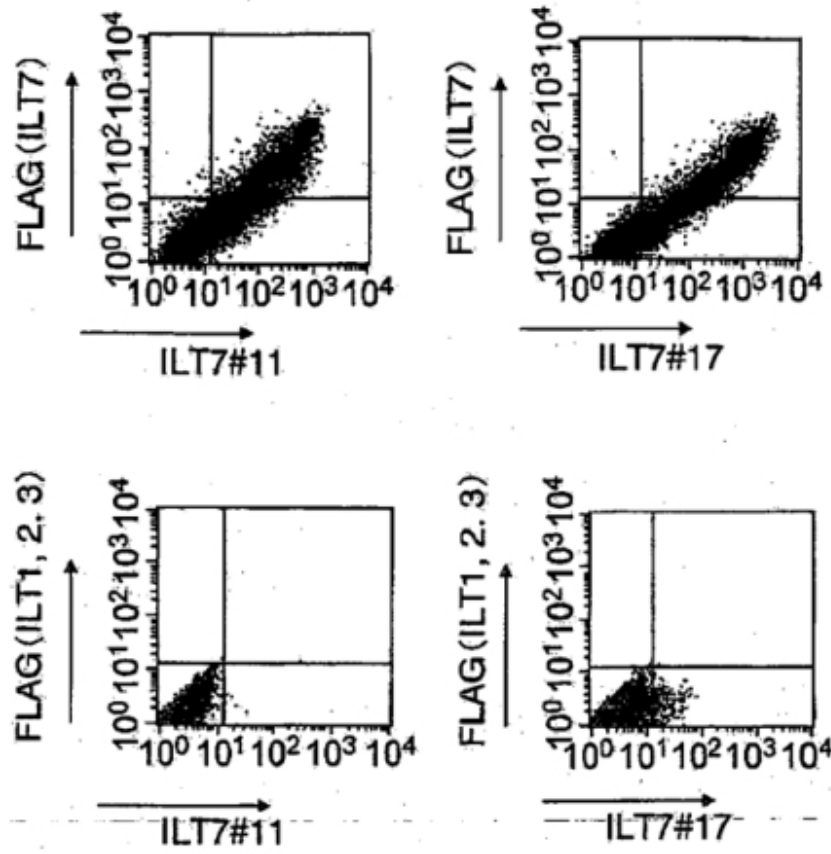


Figura 10

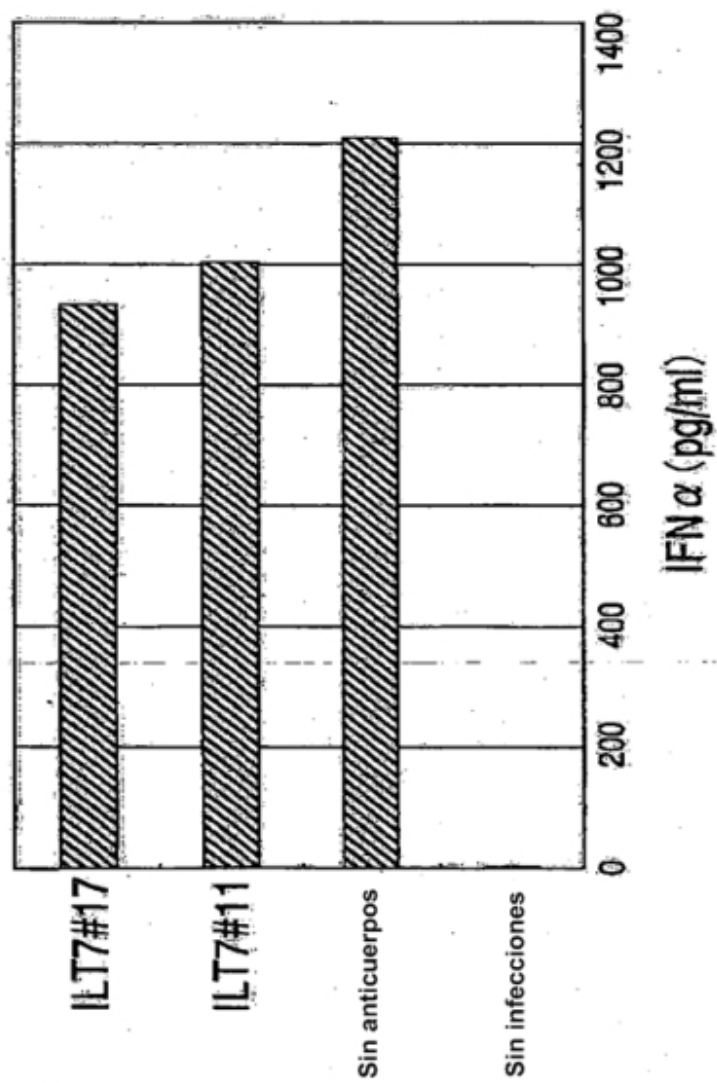


Figura 11

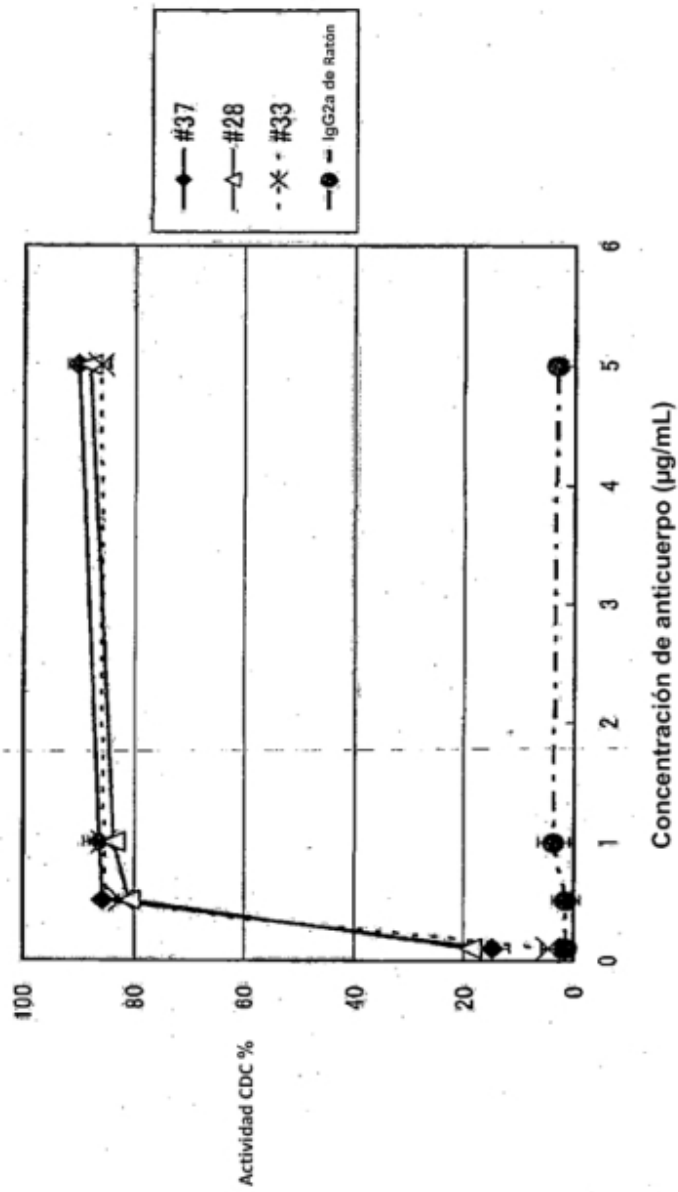


Figura 12

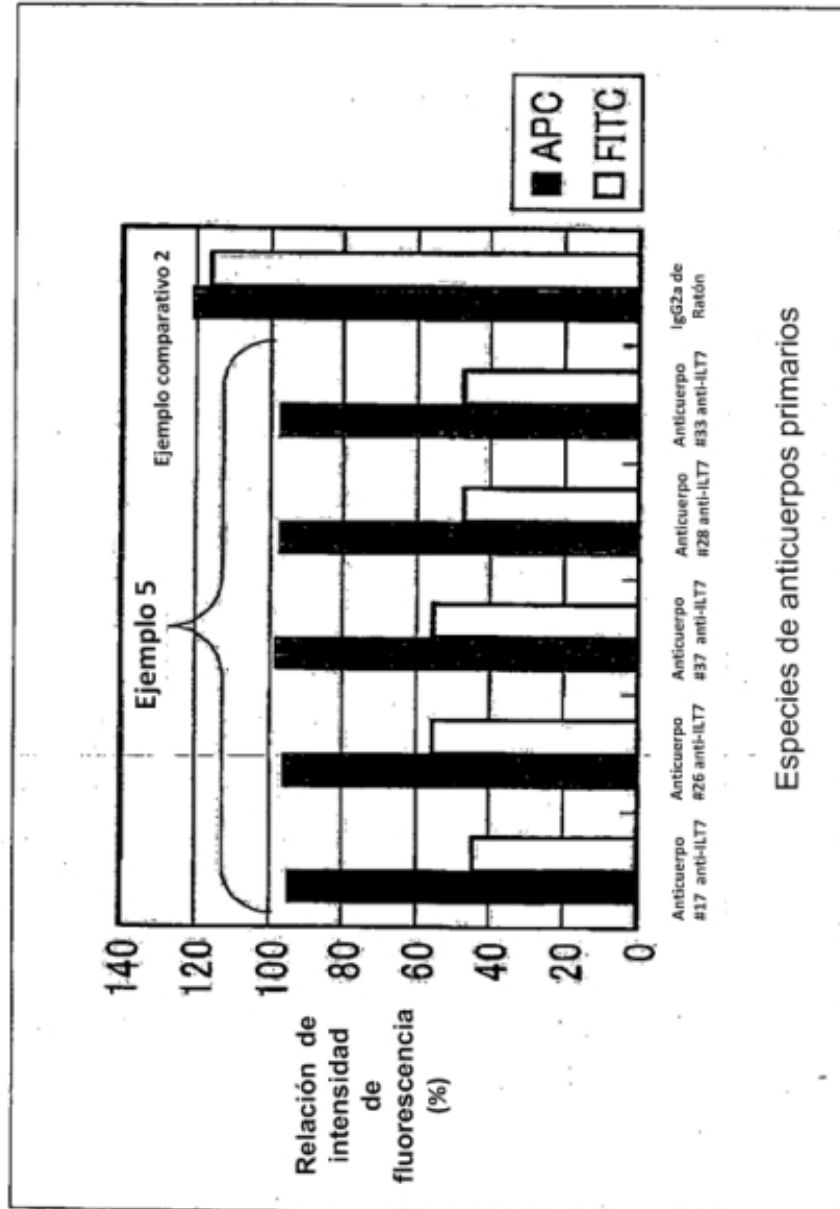


Figura 13