



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 406**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96922853 .5**

86 Fecha de presentación : **20.06.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0837936**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.1998**

54 Título: **Nueva proteína LST-1 inmunorreguladora.**

30 Prioridad: **20.06.1995 EP 95109511**
03.08.1995 EP 95112201

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE

72 Inventor/es: **Weiss, Elisabeth**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 276 406 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

Nueva proteína LST-1 inmunorreguladora.

5 Esta invención está relacionada con una proteína inmunorreguladora específica de leucocitos (LST1) y con la proteína correspondiente producida mediante técnicas recombinantes, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas con actividad LST1, métodos de utilización y de producción.

10 Las citocinas son proteínas con un peso inferior a 50 kDa, que intervienen en el intercambio de señales autocrinas, paracrinas o endocrinas entre los componentes celulares de tejidos o entre tejidos diferentes. Las citocinas identificadas hasta el momento incluyen factores de crecimiento, interleucinas e interferones y actúan sobre células en una variedad de sistemas del organismo: el sistema hematopoyético, el sistema inmunitario, el sistema nervioso, el sistema esquelético, tejidos conjuntivos y, probablemente, la mayoría del resto de tejidos y órganos del organismo (véanse las referencias A. Thompson ed. [1991], *The Cytokine Handbook*, London, Academic Press y A. Miyajima *et al.*, *Annual Reviews Immunol.* 10 [1992] 295-331). Los siguientes son ejemplos de citocinas: EGF, NGF, PDGF, FGF, IL-1 a IL-7, GM-CSF, G-CSF, MCSF, IFN, TNF- α , TGF- α y - β .

20 Hasta el momento se han identificado más de 100 citocinas. No obstante, es necesario buscar otras citocinas nuevas que puedan ser importantes para posibles avances en la asistencia médica.

Holzinger, I., *et al.* (*Immunobiology* 191 [1994] 149) y el número de Acceso a la base de datos EMBL Primate Databank u00921 describen la secuencia completa de DNA de la LST-1 humana. El número de Acceso a la base de datos EMBL Primate Databank u67841 describe una secuencia de DNA que posee una identidad del 99,7% en los 2633 pb superpuestos con el ID. de SEC. núm.: 1.

Resumen de la invención

Consecuentemente, es objeto de la presente invención proporcionar una nueva citocina que muestra nuevas propiedades biológicas.

30 Otro objeto de la presente invención es obtener la nueva proteína utilizando moléculas de DNA recombinante con capacidad para expresar dicha proteína para que así la proteína de unión tenga una mayor disponibilidad. Tanto este como otros objetos de la invención se han conseguido mediante la obtención de una proteína purificada según la invención, seleccionada de un grupo formado por una proteína con una homología de al menos el 85% con la secuencia aminoacídica del ID. de SEC. núm.: 3 y fragmentos de la misma, siendo dicha proteína capaz de unirse a un anticuerpo específico para dicha proteína o a su receptor de superficie de membrana en los leucocitos.

Descripción de realizaciones específicas

40 La invención comprende composiciones terapéuticas especialmente novedosas que contienen proteínas recombinantes producidas utilizando secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen actividad LST-1. El cDNA de LST1 que puede utilizarse para la producción de la proteína recombinante se aisló inicialmente a partir de células U-397 (DSM ACC 5) estimuladas con IFN- γ . La clonación mediante RT-PCR de mRNA de estas células dio lugar a un clon de cDNA designado pLST1 y con una longitud de 636 pb. El análisis del cDNA de LST-1 muestra que está formado por seis exones. Estos exones se denominan: 1A (pb 48-162), 1B (pb 544-652), 2 (pb 1044-1162), 3 (pb 1475-1567), 4 (pb 1775-1797) y 5 (pb 2325-2709). En el exón 5, tras la posición 2345, hay un sitio interno de empalme 5'. Por tanto, mediante corte y empalme alternativo se pueden obtener dos isoformas de la proteína LST-1 con una longitud respectiva de 104 y 97 aminoácidos (véanse los ID. de SEC. núms.: 3 y 4). El clon de cDNA humano pLST-1 contiene una región extendida en 5' que codifica codones de parada.

50 La invención está basada en una nueva proteína del tipo de las citocinas (denominada a partir de este momento proteína LST-1 o LST-1) cuya producción es estimulada en las células U-937 por el INF- γ en un factor mayor de 100, preferiblemente 1000; que se une a la superficie de los leucocitos y que:

55 a) está codificada por la secuencia de DNA mostrada en el ID. de SEC. núm.: 2 en el caso de la proteína madura, o por la secuencia genómica mostrada en el ID. de SEC. núm.: 1;

60 b) está codificada por las secuencias de DNA que hibridan bajo condiciones de astringencia con las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núms.: 1 o 2, o fragmentos de las secuencias de DNA de la región que codifica la proteína madura, o

c) está codificada por secuencias de DNA que, si no hubiera degeneración del código genético, hibridarían con las secuencias definidas en a) y b) y que codifican un polipéptido con secuencia aminoacídica,

65 d) y el marco de lectura de dicha proteína está definido por un ATG que parte de la posición 1144 del ID. de SEC. núm.: 1 y a partir del cual no puede haber cambio alguno en el marco de lectura de la región codificante de la proteína.

ES 2 276 406 T3

La proteína se puede definir mediante su secuencia de DNA (preferiblemente por su secuencia de cDNA deducida del ID. de SEC. núm.: 1) y por la secuencia aminoacídica derivada de la misma. La proteína LST-1 puede presentar variaciones alélicas naturales diferentes entre individuos. Estas variaciones de los aminoácidos normalmente son sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, también pueden ser deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos de la secuencia completa. La proteína LST-1 según la invención, cuyos tipos y extensión dependen de la célula y del tipo celular en el que se exprese, puede estar en su forma glicosilada o no glicosilada. Las proteínas LST-1 de acuerdo con el ID. de SEC. núm.: 3 y el ID. de SEC. núm.: 4 son las que se prefieren.

El mRNA de LST-1 es expresado de forma constitutiva en los linfocitos T, macrófagos, U-937 y a niveles bajos en la amígdala faríngea, pulmón e hígado humanos, lo cual puede deberse a los linfocitos y macrófagos presentes en estos tejidos. La proteína muestra una actividad inmunorreguladora. El IFN- α puede potenciar de forma importante su transcripción en células U-937. Al estimular la línea de linfocitos T Jurkat (ATCC TIB 152) con TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) solamente se observó una pequeña inducción del mRNA de LST-1. Se inicia un incremento de la expresión de mRNA pasadas cuatro horas de la estimulación, con un pico a las 8 horas, y un posterior descenso tras 24 horas después de la estimulación.

El término “actividad inmunorreguladora” significa que la proteína modula de forma directa o indirecta la cooperación de los linfocitos T con los macrófagos.

Preferiblemente, la unión a la superficie de los leucocitos se estima *in vitro* y se realiza mediante métodos ampliamente conocidos en el campo.

La expresión “hibridar bajo condiciones de astringencia” significa que dos fragmentos de ácido nucleico presentan la capacidad de hibridar entre sí en las condiciones estándar de hibridación descritas en Sambrook *et al.*, “Expression of cloned genes in *E. coli*” en Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE. UU., 9.47-9.62 y 11.45 - 11.61.

De forma más específica, las condiciones de astringencia tal como aquí se utilizan se refieren a la hibridación en NaCl a 1 mol/l, SDS al 1% y sulfato de dextrano al 10%. A continuación se realizan dos lavados del filtro a temperatura ambiente de 5 minutos en 2 x SSC y un lavado final de 30 minutos. Este lavado final se puede realizar a 65°C en 0,5 x SSC, SDS al 0,1%; más preferiblemente en 0,2 x SSC, SDS al 0,1%; y más preferiblemente en 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Los expertos en la materia reconocerán que hay otras condiciones que confieren el mismo grado de astringencia y que están englobadas dentro de la expresión “bajo condiciones de astringencia” así como dentro de la invención.

La proteína LST-1 se encuentra activa en su forma glicosilada y en su forma no glicosilada. Esta última puede producirse mediante tecnología recombinante en células procariotas.

La expresión “proteínas con actividad LST-1” también incluye proteínas con variaciones menores de aminoácidos, pero con sustancialmente la misma actividad LST-1. Con “sustancialmente la misma” nos referimos a que la actividad de las diferentes proteínas posee las mismas propiedades biológicas y que las proteínas presentan una homología en cuanto a la secuencia aminoacídica de al menos el 85%. Más preferiblemente, las secuencias aminoacídicas son idénticas en un 90%. Es posible purificar LST-1 a partir de células U-937 por cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo monoclonal frente a LST-1. También se prefiere la utilización de otras técnicas de purificación de proteínas, como las siguientes: inmunoprecipitación, filtración en gel, intercambio de iones, cromatografía, cromatoenfoco, isoelectroenfoco, precipitación selectiva, electroforesis y similares. La fracción aislada durante los procesos de purificación puede analizarse en busca de la presencia de actividad LST-1 mediante el uso de anticuerpos específicos para LST-1.

La proteína de acuerdo con la invención también puede producirse mediante métodos recombinantes. La proteína LST-1 se obtiene en su forma no glicosilada cuando se produce de forma recombinante en procariotas. Con ayuda de las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas por la invención, es posible buscar el gen de la LST-1, o sus variantes, en los genomas de cualquier célula que se desee (p. ej. además de las células humanas, también en células de otros animales), para identificarlo y aislar el gen deseado que codifique la proteína LST-1. Los expertos en la materia conocen muy bien tanto estos procesos como las condiciones adecuadas de hibridación y, por ejemplo, se describen en Sambrook, J., *et al.*, “Expression of cloned genes in *E. coli*” en Molecular Cloning: A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE. UU.; y B.D. Hames, S.G. Higgins, Nucleic acid hybridisation - a practical approach (1985) IRL Press, Oxford, Inglaterra. En este caso, para los experimentos normalmente se utilizan los protocolos estándar descritos en estas publicaciones.

La utilización de tecnología de DNA recombinante permite la producción de una gran cantidad de derivados de la proteína LST-1. Estos derivados pueden modificarse, por ejemplo, en un único aminoácido o en varios mediante sustitución, deleción o adición. La formación de derivados puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida. Cualquier experto en la materia puede realizar fácilmente estas variaciones (J. Sambrook, B.D. Hames, loc. cit.). Sencillamente se debe asegurar que se conservan las propiedades características de la proteína LST-1 (la inhibición de las líneas celulares antes mencionadas). Por lo tanto, la invención concierne además a una proteína LST-1 que es producto de la expresión procarionótica o eucariótica de un DNA exógeno.

ES 2 276 406 T3

La invención implica el uso de una molécula de ácido nucleico que sirve para asegurar la expresión en una célula huésped procariota o eucariota de una proteína LST-1 y que se selecciona del grupo formado por:

- a) las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núm.: 1 y 2, o las secuencias complementarias,
- b) secuencias de ácido nucleico que hibridan bajo condiciones de astringencia con una de las secuencias de a),
- c) secuencias de ácido nucleico que hibridarían con una de las secuencias de a) o b) si no hubiera degeneración del código genético,
- d) y el marco de lectura de dicha proteína está definido por un ATG que parte de la posición 1144 del ID. de SEC. núm.: 1 y a partir del cual no puede haber cambio alguno en el marco de lectura de la región codificante de la proteína.

Gracias a estos ácidos nucleicos que codifican una proteína LST-1, es posible obtener la proteína de acuerdo con la invención de forma repetida y en grandes cantidades. Para la expresión en organismos procariotas o eucariotas, como células huésped procariotas o células huésped eucariotas, el ácido nucleico se integra en vectores de expresión adecuados siguiendo los métodos conocidos por los expertos en el campo. Dichos vectores de expresión deben contener preferiblemente un promotor regulable o inducible. Entonces, estos vectores se introducen en células huésped adecuadas para que se expresen como, p. ej., *E. coli* como célula huésped procariota; o *Saccaromyces cerevisiae*, la línea celular de teratocarcinoma PA-1 sc 9117 (Büttner *et al.*, Mol. Cell Biol. 11 [1991] 3573-3583), células de insecto, células CHO o COS como células huésped eucariotas; y las células huésped transformadas o transducidas se cultivan bajo unas condiciones que permitan la expresión del gen heterólogo. El aislamiento de la proteína puede llevarse a cabo siguiendo los métodos conocidos a partir de la célula huésped o del sobrenadante del cultivo de células huésped. Estos métodos están descritos, por ejemplo, en Ausubel I., Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, New York. También es posible que sea necesaria la reactivación *in vitro* de la proteína.

Además, la invención implica un proceso de obtención de una proteína LST-1 mediante aislamiento del sobrenadante del cultivo de la línea celular U-p937 a través de la separación cromatográfica en gel y la purificación de una fracción.

La detección de células huésped transformadas o transducidas que producen de forma recombinante la proteína LST-1 y la purificación de la proteína se llevan a cabo mediante anticuerpos de unión a esta proteína. Estos anticuerpos se pueden obtener de forma sencilla mediante métodos conocidos utilizando la proteína de la invención como un antígeno o un inmunógeno.

Por tanto, la invención también engloba la utilización de la proteína con actividad LST-1 de acuerdo con la invención para la producción de anticuerpos de unión a esta proteína.

Los anticuerpos anti-LST-1 se producen por inmunización de un huésped vertebrado adecuado con LST-1 purificada o con derivados polipeptídicos de la misma, preferiblemente con un adyuvante. Estas técnicas se conocen ampliamente en la literatura médica y están descritas, por ejemplo, en Harlow and Lane eds., Antibodies: A laboratory manual (1988), Cold Spring Harbor Laboratories Press.

Este proceso consiste en la inmunización de animales de uso habitual con esta finalidad, en concreto ovejas, conejos o ratones, con la proteína según la invención y posteriormente aislar el antisuero de los animales inmunizados siguiendo los métodos conocidos; o bien, fusionar células esplénicas de los animales inmunizados con células inmortalizadas, como p. ej. células de mieloma, de acuerdo con el método de Köhler y Milstein (Nature 256 (1975) 495-497). Entre las células de hibridoma obtenidas de esta forma, se seleccionan las células que producen un anticuerpo monoclonal frente a la proteína LST-1 y se clonan. Los anticuerpos monoclonales o policlonales obtenidos de esta forma pueden estar unidos a un material de soporte, como p. ej. celulosa, para la purificación por inmunoabsorción de la proteína inhibidora de melanoma. Además, los anticuerpos de este tipo pueden utilizarse para la detección de la proteína LST-1 en muestras como, p. ej., secciones de tejido o líquidos corporales.

Por consiguiente, la invención engloba también anticuerpos frente a la proteína LST-1 que se pueden obtener mediante la inmunización de un animal con una proteína LST-1 y el aislamiento de los anticuerpos a partir del suero o de las células esplénicas de los animales inmunizados.

Ha resultado, además, que la proteína LST-1 presenta una actividad inmunorreguladora.

La invención también incluye la utilización de una proteína de acuerdo con la invención para la producción de un agente terapéutico que puede utilizarse en el tratamiento antitumoral o como un agente inmunorregulador.

Si se desea, la proteína de acuerdo con la invención se procesa, si se desea junto con coadyuvantes, excipientes de relleno o aditivos habitualmente utilizados, en una formulación farmacéutica para las aplicaciones terapéuticas mencionadas.

Por lo tanto, la invención también comprende una composición terapéutica que contiene una proteína LST-1 según la invención y, si se desea, junto con coadyuvantes, excipientes de relleno o aditivos que se utilizan habitualmente.

ES 2 276 406 T3

La invención también implica el uso de secuencias del gen de la LST-1, preferiblemente moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína con actividad LST-1, o la activación de polinucleótidos de la región 5' no traducida, en la terapia génica y, en particular, para la producción de medicamentos para la terapia génica.

5 La terapia génica en células somáticas se puede conseguir utilizando, p. ej., vectores retrovirales, otros vectores víricos o mediante transferencia de genes no víricos (para mayor claridad véase T. Friedmann, *Science* 244 [1989] 1275; Morgan 1993, RAC DATA MANAGEMENT REPORT, junio 1993).

10 Los vectores adecuados para la terapia génica son, por ejemplo, retrovirus (Mulligan, R.C. [1991] en Nobel Symposium 8: Etiology of human disease at the DNA level, Lindsten, J. & Pattersun Editors, 143-189, Raven Press), virus adenoasociados (McLughlin, J. *Virology* 62 [1988] 1963), virus vaccinia (Moss *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 5 [1987] 305), virus del papiloma bovino (Rasmussen *et al.*, *Methods Enzymol.* 139 [1987] 642) o virus del grupo herpes como el virus de Epstein Barr (Margolske *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8 [1988] 2937) o el virus herpes simplex.

15 También se conocen sistemas de administración no víricos. En esos casos se utilizan normalmente ácidos nucleicos "desnudos", preferiblemente DNA, o ácido nucleico junto con un auxiliar como, p. ej., reactivos de transferencia (liposomas, dendrímeros, conjugados de polilisina-transferrina) (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 [1987] 7413).

20 Otro método preferido de terapia génica está basado en la recombinación homóloga. Este sistema consiste en; o bien, insertar una o varias copias del gen que codifica la proteína LST-1 en el genoma de células somáticas; o bien, modular, preferiblemente activar, el gen de la LST-1 que está presente de forma endógena en las células.

25 Los métodos de recombinación homóloga están descritos en, p. ej., Kucherlapati, *Proc. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* 36 (1989) 301; Thomas *et al.*, *Cell* 44 (1986) 419-428; Thomas and Capecchi, *Cell* 51 (1987) 503-512; Doetschman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8583-8587 y Doetschman *et al.*, *Nature* 330 (1987) 576-578. En estos métodos, una porción de DNA que tiene que integrarse en un lugar específico del genoma (fragmento génico de LST-1) se une a un DNA de reconocimiento. Este DNA de reconocimiento es un DNA complementario (homólogo) a una región (preferiblemente comprendida en el gen de la LST-1 o proximal al mismo) del DNA genómico. Cuando dos porciones homólogas de un DNA de cadena única (p. ej. el DNA de reconocimiento y el DNA genómico) se encuentran muy próximos entre sí hibridarán y formarán una hélice de doble cadena. Por tanto, el fragmento del gen de la LST-1 y el DNA de reconocimiento pueden integrarse en el genoma a través de la recombinación. Esta recombinación homóloga puede realizarse tanto *in vitro* como *in vivo* (en el paciente).

35 Se utiliza preferiblemente un DNA que codifique una proteína que tenga actividad LST-1, un fragmento que inhiba la expresión LST-1 (secuencia *knock out*) o un fragmento capaz de activar, tras la integración del genoma de una célula, la expresión en esta célula de una proteína que tenga actividad LST-1. Este fragmento puede ser un promotor o una región activadora, por ejemplo, que sea heterólogo respecto a la región LST-1 correspondiente o que, tras la integración en el gen de la LST-1, active la transcripción o la traducción del gen de la LST-1 que en ese momento se encuentra silente o se expresa muy poco.

40 Por tanto, mediante este DNA, se introducen nuevamente uno o más genes de LST-1 dentro de la célula diana, o bien el gen que básicamente es silente a nivel transcripcional en el genoma de una célula de mamífero se activa de tal forma que la célula adquiere la capacidad de producir proteína LST-1 endógena. Para conseguir esto, se inserta un constructo de DNA en el genoma mediante recombinación homóloga; el constructo de DNA contiene: un elemento regulador del DNA con capacidad para estimular la expresión de este gen si está unido funcionalmente al mismo y uno o varios segmentos diana de DNA que son homólogos a una región en este genoma, región que está dentro de este gen o próxima al mismo. Este constructo se inserta en el genoma de la célula de mamífero de tal forma que el segmento regulador está unido funcionalmente al gen que codifica la proteína con actividad LST-1. Preferiblemente, el constructo también contiene secuencias de amplificación, especialmente si los genes que codifican proteínas con actividad LST-1 se insertan dentro de la célula.

55 Para la introducción de genes de LST-1 dentro de las células diana, el constructo contiene un elemento regulador, uno o varios genes de LST-1 y uno a varios segmentos diana. Los segmentos diana se escogen en función de que hibriden con una región apropiada del genoma donde se expresan los genes exógenos de LST-1 insertados tras la recombinación homóloga.

60 Se conocen una gran cantidad de procesos mediante los que es posible iniciar la recombinación homóloga. Preferiblemente, la recombinación homóloga ocurre durante la replicación del DNA o mitosis de las células. Un DNA de este tipo puede utilizarse para la producción de un agente destinado al tratamiento terapéutico de tumores o para la producción de proteína LST-1 homóloga o heteróloga en un organismo huésped.

65 Cabe la posibilidad de suministrar un ensayo basado en las secuencias de ácido nucleico de la proteína LST-1 proporcionada por la invención, que puede utilizarse para detectar ácidos nucleicos que codifiquen proteínas LST-1. Una prueba de este tipo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en células o lisados celulares utilizando diagnósticos mediante ácidos nucleicos. En este caso, la muestra a examinar se pone en contacto con una sonda que hibridaría con la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína LST-1. Una hibridación entre la sonda y los ácidos nucleicos de la muestra indica la presencia de proteínas LST-1 expresadas. Estos métodos son muy conocidos por los expertos en

ES 2 276 406 T3

el campo y se describen, por ejemplo, en WO 89/06698, EP-A 0 200 362, USP 2915082, EP-A 0 063 879, EP-A 0 173 251, EP-A 0 128 018. En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico de la muestra que codifica una proteína LST-1 se amplifica previamente a la realización de la prueba mediante, por ejemplo, la conocida técnica de la PCR. En el campo del diagnóstico mediante ácidos nucleicos habitualmente se utiliza una sonda de ácido nucleico derivada (marcada). Esta sonda se pone en contacto con un DNA o RNA desnaturalizado unido a un transportador y, en este proceso, se seleccionan la temperatura, fuerza iónica, valor del pH y otras condiciones de tampón de tal forma que, en función de la longitud de la muestra de ácido nucleico y de la temperatura de fusión resultante del híbrido esperado, el DNA o RNA marcado puede unirse a DNA o RNA homólogo (hibridación, véase también Southern, EM., J. Mol. Biol. 98 (1975), 503-517; Wahl, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 3683-3687). Los transportadores adecuados son membranas o materiales transportadores cuyo componente principal es la nitrocelulosa (p. ej. Schleicher and Schüll, BA 85, Amersham Hybond, C.), nitrocelulosa reforzada o unida en forma de polvos o membranas de *nylon* modificadas con varios grupos funcionales (p. ej. el grupo nitro) (p. ej. Schleicher and Schüll, Nytran; NEN, Gene Screen; Amersham Hybond M.; Pall Biodyne).

El DNA o RNA hibridado se detecta entonces mediante la incubación del transportador, tras un lavado y saturación exhaustivos para evitar la unión inespecífica, con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se dirige hacia la sustancia incorporada en la sonda de ácido nucleico durante la modificación. A su vez, el anticuerpo también está marcado. Sin embargo, también es posible utilizar un DNA marcado de forma directa. Tras la incubación con los anticuerpos, se lava de nuevo para detectar solamente los conjugados de unión específica del anticuerpo. La determinación se lleva a cabo a través del marcador del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según los métodos estándar.

La detección de la expresión de LST-1 se puede realizar, por ejemplo, de cualquiera de las siguientes maneras:

-- hibridación *in situ* con células completas inmovilizadas utilizando frotis de tejidos inmovilizados y cromosomas metafásicos aislados,

-- hibridación de colonias (células) e hibridación de calvas (fagos y virus),

-- hibridación Northern (detección de RNA),

-- análisis sérico (p. ej. análisis del tipo celular de las células del suero mediante análisis de transferencia *slot-blot*),

-- tras la amplificación (p. ej. técnica de la PCR).

La invención incluye por tanto un método para la detección de ácidos nucleicos que codifiquen una proteína LST-1, que se caracteriza porque la muestra a examinar es incubada con una sonda de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

a) las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núms.: 1 y 2, o una secuencia complementaria a estas;

b) ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones de astringencia con una de las secuencias de a).

Se incuba la sonda de ácido nucleico con los ácidos nucleicos de la muestra y se detecta la hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con la sonda de ácidos nucleicos, si se desea, mediante otra pareja de unión.

Así, la proteína LST-1 es un marcador pronóstico en el diagnóstico tumoral (metástasis, progreso) y un marcador de la actividad en la proliferación celular, especialmente para los linfocitos T leucémicos.

A la línea celular U-937 de linfoma histiocítico humano se le asignó el número de depósito DSM ACC 5 y se encuentra desde el 3 de abril de 1990, donde está a libre disposición del público, en la colección pública de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig.

Boehringer Mannheim GmbH depositó el plásmido pLST-1 que contiene el gen de la LST-1 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig el 24 de mayo de 1995 y se le asignó el número DSM 10011.

La lista de secuencias junto con los ejemplos que vienen a continuación explican con más detalle la invención. En este caso:

ID. de SEC. núm. 1 denota la secuencia nucleotídica de la región genómica de LST-1.

En la posición 2841 se encuentra un sitio de restricción polimórfico de Pvu II. La caja TATA, el sitio de activación mediante IFN- γ (Fc γ R1) y el elemento que responde al factor génico 2 inducido por interferón (ISGF-2) se inician en las posiciones 279, 1509 y 1814, respectivamente. Se ha presentado la secuencia de DNA a la base de datos GenBank (número de acceso U00921).

ES 2 276 406 T3

ID. de SEC. núm. 2 denota proteína y cDNA de LST-1.

ID. de SEC. núm. 3 denota la secuencia de la proteína LST-1 (104 aminoácidos).

5 ID. de SEC. núm. 4 denota la secuencia de la proteína LST-1 (isoforma de 97 aminoácidos)

Abreviaturas: BAT, transcrito asociado a HLA-B; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; LST-1, transcrito específico de leucocitos 1; pLst1, clon de cDNA de LST-1; MER, repeticiones de la frecuencia media de reiteración; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; TNFA, gen que codifica el TNF- α ; TNFB, gen que codifica el factor de necrosis tumoral β ; LTB, gen que codifica la linfotóxina β .

Ejemplo 1

15 *Aislamiento de la región genómica de LST-1*

La línea de linfocitos B humanos CAH se estableció a partir de un individuo homocigótico de tipo HLA-A3, -Bw47, -Cw6 y -DR7. Se utilizó DNA genómico para generar la biblioteca de cósmidos cah en el vector pTCF como se ha descrito previamente (EH. Weiss *et al.*, Immunobiology 170 [1985] 367-380). Se aislaron varios cósmidos mediante hibridación con una sonda de TNFA. Se obtuvo un subclón derivado del cósmido cah5 que contenía la región anterior al extremo 5' del gen LTB mediante restricción por la endonucleasa Hind III de cah5. La religación del producto de la digestión dio lugar a un clon truncado (cah5dH3) de 18 kb de longitud. Se aislaron cinco fragmentos PstI adyacentes de 1,5 kb, 0,8 kb, 3,1 kb, 0,4 kb y 0,7 kb denominados Pst6, Pst4, Pst11, Pst400 y Pst700, respectivamente, y se subclonaron en el vector pUC19.

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia nucleotídica

Los subclones Pst4, Pst6 y Pst11, y dos fragmentos PstI 5' de 400 y 700 pb respectivamente (Pst400 y Pst700), se secuenciaron en ambas direcciones con el método de terminación de cadena mediante didesoxinucleótidos utilizando bien la Sequenase 2.0 (USB, Braunschweig, Alemania) o la T7 polimerasa (Pharmacia, Freiburg, Alemania). La organización genómica de estos fragmentos se determinó mediante la secuenciación directa de cah5dH3 a lo largo de los sitios de restricción de PstI empleando oligonucleótidos. Esto confirmó el orden y descartó la posibilidad de que cualquier fragmento pequeño estuviera situado entre los fragmentos de restricción Pst6, Pst4, Pst11, Pst400 y Pst700.

Ejemplo 3

Cultivos celulares y experimentos de estimulación

Se cultivaron linfocitos T Jurkat humanos no adherentes, la línea celular U-937 histiocítica humana y la línea celular monocítica humana MonoMac6 en medio de cultivo RPMI 1640. Las líneas adherentes de carcinoma epitelial A431 y HeLa se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). En ambos medios se utilizó como complemento suero fetal bovino al 10% inactivado por calor, penicilina/estreptomina al 1% y L-glutamina al 1% (todos adquiridos en Gibco-BRL, Berlín, Alemania). Todas las células se cultivaron en CO₂ al 5% y a 37°C en atmósfera humidificada. La estimulación de las células Jurkat se realizó con 50 ng/ml de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Sigma, Deisenhofen, Alemania) y 5 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma). La línea de células monocíticas humanas MonoMac6 se estimuló con 1 mg/ml de lipopolisacáridos (preparados a partir de *Salmonella minnesota*; Sigma) durante 4 horas. La línea celular histiocítica U-937 se estimuló con 200 U/ml de interferón γ durante 48 horas.

Ejemplo 4

Clonación, caracterización y expresión del cDNA de LST-1

La transcripción inversa de RNA, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de mRNA aislado de células U-937 estimuladas con interferón- γ , dio lugar a un clon de cDNA designado pLst1 de 636 pb de longitud. Esto concuerda con el tamaño del mRNA detectado mediante transferencia Northern de unos 800 pb de longitud, debido a una longitud esperada de la cola de poli(A) de unos 200 pb. La secuencia de cDNA de pLst1 era idéntica a las regiones codificantes de la secuencia genómica clonada a partir de una línea celular humana diferente. El análisis de secuencias reveló tres regiones bien conservada entre la LST-1 humana y el transcrito B144 murino, y que podrían asignarse al exón 2-4 del gen humano.

Igual que en el caso del resto de genes de la región TNF, LST-1 consta de seis exones (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) y cinco intrones. La orientación de su transcripción es la misma que la de TNFA y TNFB, pero la contraria al gen LTB adyacente. Este resultado no concuerda con la orientación del gen del B144 murino tal como especifica la organización de la región H-2D^b publicada por J.M. Wroblewski *et al.*, Immunogenetics 32 (1990) 200-204. El clon de cDNA pLst1 humano contiene una región 5' extendida que codifica codones de parada en los tres marcos de lectura y por tanto puede considerarse como completo. El cDNA de LST-1 posiblemente codifica una proteína de transmembrana.

ES 2 276 406 T3

El cDNA de LST-1 puede expresarse en procariotas, preferiblemente en *E. coli*, utilizando un vector apropiado (p. ej. pBR 322). La proteína puede aislarse tras la secreción o bien a partir de cuerpos de inclusión citoplasmáticos acumulados y posteriormente madurados.

5 Ejemplo 5

Expresión de LST-1

10 El mRNA de LST-1 se expresa de forma constitutiva en los linfocitos T, macrófagos, U-937 y a niveles bajos en la amígdala faríngea, pulmón e hígado humanos, lo cual puede deberse a los linfocitos y macrófagos presentes en estos tejidos. En las líneas celulares epiteliales como las células HeLa y A431, no se detectaron transcritos de LST-1 (datos no mostrados). Este patrón de expresión nos impulsó a nombrar al gen correspondiente como transcrito específico de leucocitos 1 (LST-1, del inglés *Leucocyte Specific Transcript-1*). Los niveles de transcripción pueden potenciarse de forma importante en las células U-937 mediante la estimulación con interferón- γ , pero no con lipopolisacáridos en 15 la línea celular de macrófagos MonoMac6. Al estimular la línea de linfocitos T Jurkat con TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) se indujo la expresión transitoria del mRNA de LST-1 por encima del nivel constitutivo. Tras la inducción, el nivel de expresión del mRNA aumentó pasadas cuatro horas, con un pico a las 8 horas y descendió tras 24 horas después de la estimulación.

20 Lista de referencias

Ausubel, I., Frederick, M., *Current Protocols in Mol. Biol.* (1992), John Wiley and Sons, New York

Büttner et al., *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 3573-3583

25

Doetschman et al., *Nature* 330 (1987) 576-578

Doetschman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8583-8587

30

EP-A 0 173 251

EP-A 0 063 879

EP-A 0 128 018

35

EP-A 0 200 362

Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7413

40

Friedmann, T., *Science* 244 (1989) 1275; Morgan 1993, RAC DATA MANAGEMENT REPORT, junio 1993

Hames, B.D., Higgins, S.G., *Nucleic acid hybridisation - a practical approach* (1985) IRL Press, Oxford, Inglaterra

Harlow and Lane eds., *Antibodies: A laboratory manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratories Press

45

Köhler and Milstein, *Nature* 256 (1975) 495-497

Kucherlapati, *Proc. in Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.* 36 (1989) 301

50

Margolskee et al., *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 2937

McLughlin, *J. Virol.* 62 (1988) 1963

Miyajima, A., et al., *Annual Reviews Immunol.* 10 (1992) 295-331

55

Moss et al., *Ann. Rev. Immunol.* 5 (1987) 305

Mulligan, R.C. (1991) en Nobel Symposium 8: Etiology of human disease at the DNA level, Lindsten, J. and Pattersun Editors, 143-189, Raven Press

60

Rasmussen et al., *Methods Enzymol.* 139 (1987) 642

Sambrook, J., et al., "Expression of cloned genes in *E. coli*" in *Molecular Cloning: A laboratory manual* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE. UU., 9.47-9.62 y 11.45-11.61

65

Southern, E.M., *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503

Thomas and Capecchi, *Cell* 51 (1987) 503-512

ES 2 276 406 T3

Thomas et al., *Cell* 44 (1986) 419-428

Thompson, A., ed. (1991), *The Cytokine Handbook*, London, Academic Press

5 USP 2915082

Wahl, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), 3683-3687

10 **Weiss, E.H., et al.**, *Immunobiology* 170 (1985) 367-380

WO 89/06698

Wroblewski, J.M., et al., *Immunogenetics* 32 (1990) 200-204.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 276 406 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína inmunorreguladora con un tamaño de unos 97 a 104 aminoácidos; cuya producción está estimulada en células U-937 por el IFN- γ en un factor mayor de 100; que se une a la superficie de los leucocitos; y que:
- a) está codificada por la secuencia de DNA mostrada en el ID. de SEC. núm.: 2 en el caso de la proteína madura o por la secuencia genómica mostrada en el ID. de SEC. núm.: 1, o
- 10 b) está codificada por secuencias de DNA que hibridan con las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núm.: 1 o 2 o con fragmentos de estas secuencias de DNA de la región que codifica la proteína madura.
- 15 2. Una proteína como la reivindicada en la reivindicación 1, que se puede obtener del sobrenadante del cultivo celular de la línea celular U-937 tras la estimulación de la línea celular mediante IFN- γ y la purificación mediante cromatografía en gel y HPLC en fase inversa.
3. Una proteína como la reivindicada en las reivindicaciones 1 o 2, que
- a) es producto de una expresión procariota o eucariota de un DNA exógeno,
- 20 b) está codificada por
- i) la secuencia de DNA mostrada en el ID. de SEC. núm.: 2, en el caso de la proteína madura o en el de la proteína con una presecuencia N-terminal, o por la secuencia genómica mostrada en el ID. de SEC. núm.: 1,
- 25 ii) las secuencias de DNA que hibridan con las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núm.: 1 o 2 o con fragmentos de estas secuencias de DNA de la región que codifica la proteína madura, o
- 30 iii) las secuencias de DNA que, si no hubiera degeneración del código genético, hibridarían con las secuencias definidas en i) e ii) y que codifican un polipéptido con la misma secuencia aminoacídica,
- c) se une a la superficie de los leucocitos,
- d) y el marco de lectura de dicha proteína está definido por un ATG que comienza en la posición 1144 del ID. de SEC. núm.: 1.
- 35 4. Una proteína como la reivindicada en las reivindicaciones 1 a 3, que posee la secuencia aminoacídica de los ID. de SEC. núm.: 3 o 4.
- 40 5. Una molécula de cDNA que sirve para asegurar la expresión en una célula huésped procariota o eucariota de una proteína como la reivindicada en una de las reivindicaciones 1 a 4, la secuencia de la cual se selecciona del grupo formado por:
- 45 a) las secuencias de DNA mostradas en los ID. de SEC. núm.: 1 o 2 o las secuencias de DNA complementarias,
- b) secuencias de ácido nucleico que hibridan con una de las secuencias de a),
- c) secuencias de ácido nucleico que, en caso de que no haya degeneración del código genético, hibridarían con una de las secuencias enunciadas en a) o b),
- 50 y en la que el marco de lectura de dicha proteína está definido porque el ATG comienza en la posición 1144 del ID. de SEC. núm.: 1.
- 55 6. El plásmido DSM 10011.
7. Una molécula de DNA que tiene la secuencia mostrada en el ID. de SEC. núm.: 2.
8. Un vector recombinante de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína como las reivindicadas en las reivindicaciones 1 a 4 y que expresa el ácido nucleico que codifica la proteína en un microorganismo transformado o en una célula eucariota transformada.
- 60 9. Una célula huésped procariota o eucariota que es transfectada con un cDNA que codifica una proteína como las reivindicadas en las reivindicaciones 1 a 4 y que puede producir la proteína mencionada.
- 65 10. La célula huésped reivindicada en la reivindicación 9, que es *E. coli* o una línea celular de mamífero.

ES 2 276 406 T3

11. La utilización de una molécula de cDNA que codifica una proteína como las reivindicadas en las reivindicaciones 1 a 4, para la transfección de una célula huésped procariota o eucariota.

12. Un proceso para la obtención de una proteína según la reivindicación 1, de unión a la superficie de los leucocitos, mediante su aislamiento a partir del sobrenadante del cultivo de la línea celular U-937 estimulada con IFN- γ , su separación por cromatografía en gel y la purificación de una fracción del sobrenadante que corresponde a una proteína de unos 97 a 104 aminoácidos.

13. Un proceso de producción por recombinación de una proteína de unión a la superficie de leucocitos mediante la expresión de un cDNA como el reivindicado en una de las reivindicaciones 5 o 7 en una célula huésped adecuada y el aislamiento de la proteína a partir de la célula huésped o del sobrenadante del cultivo de la célula huésped.

14. El uso de una proteína, que se une a la superficie de los leucocitos como la reivindicada en una de las reivindicaciones 1 a 4, como antígeno o inmunógeno para la producción de anticuerpos que se unan a esta proteína.

15. Un anticuerpo frente a una proteína según las reivindicaciones 1 a 4, que se puede obtener mediante la inmunización de un animal con una proteína como las reivindicadas en una de las reivindicaciones 1 a 4 y el aislamiento de los anticuerpos del suero o las células esplénicas de los animales inmunizados.

16. Un método para la detección de ácidos nucleicos que codifican una proteína según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra a examinar se incuba con una sonda de ácido nucleico seleccionada del grupo formado por:

- a) DNA con las secuencias mostradas en los ID. de SEC. núm.: 1 o 2 o sus secuencias complementarias,
- b) ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones de astringencia con una de las secuencias de a).

La sonda de ácido nucleico se incuba con el ácido nucleico de la muestra y la hibridación del ácido nucleico de la muestra con la sonda de ácido nucleico se detecta, si se desea, mediante otra pareja de unión diferente.

17. El método de la reivindicación 16, en el que se amplifica el ácido nucleico a detectar antes del paso de detección.

18. Un proceso para la producción de una proteína según las reivindicaciones 1 a 4, que comprende los siguientes pasos: expresar en una célula de mamífero el gen endógeno para esta proteína mediante la inserción de un constructo de DNA dentro del genoma de la célula mediante recombinación homóloga, conteniendo dicho constructo de DNA un elemento regulador del DNA con capacidad de estimular la expresión de dicho gen si está unido funcionalmente a él, además de uno o varios segmentos diana de DNA homólogos a una región de este genoma que se encuentra dentro de dicho gen o está próximo a él; cultivar las células; y recuperar dicha proteína de las células o del sobrenadante del cultivo celular.

19. Un proceso para la producción de una proteína según las reivindicaciones 1 a 4, que comprende los siguientes pasos: expresar en una célula de mamífero al menos un gen exógeno que codifica esta proteína mediante la inserción de un constructo de DNA dentro del genoma de la célula mediante recombinación homóloga, conteniendo dicho constructo de DNA un elemento regulador del DNA con capacidad de estimular la expresión de dicho gen si está unido funcionalmente a él, un elemento de DNA que codifique dicha proteína y además uno o varios segmentos diana de DNA homólogos a una región de este genoma; cultivar las células; y recuperar dicha proteína de las células o del sobrenadante del cultivo celular.

20. La utilización de un constructo de DNA que puede introducirse dentro del genoma de células de mamífero mediante recombinación homóloga, que contiene:

- un elemento regulador de DNA con capacidad de modular la expresión de un gen si está unido funcionalmente al mismo,

siendo un gen que codifica una proteína de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4,

- y uno o varios segmentos diana de DNA homólogos a una región de este genoma,

estando la región dentro de dicho gen o próxima al mismo,

y que puede ser insertado dentro de dicho genoma de la célula de mamífero de tal forma que el elemento regulador esté unido funcionalmente al gen que codifica dicha proteína,

para la preparación de un agente terapéutico antitumoral o un agente inmunorregulador.

65

ES 2 276 406 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
 - (B) CALLE: Sandhofer Str. 116
 - (C) CIUDAD: Mannheim
 - 10 (E) PAIS: Alemania
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): D-68305
 - (G) TELÉFONO: 0885660-3446
 - 15 (H) TELEFAX: 0885660-3451
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nueva proteína LST-1 inmunorreguladora
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 20 (iv) MODO DE LECTURA INFORMÁTICA:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn copia núm. 1.0, versión núm. 1.30B (EPO)

(2) INFORMACIÓN DEL ID. de SEC. núm.: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 5581 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 35 (C) TIPO DE CADENA: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- 40 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 48..162
- 45 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 544..652
- 50 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 1044..1162
- 55 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 1475..1567
- 60 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 1775..1797
- 65 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) SITUACIÓN: 2325..2709

ES 2 276 406 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. de SEC. núm.: 1:

5	GAGCCGAACT TCCTCTCCTA ACAATGCTGG GGAGGAACCC AGCCTGGGGG AGAAGTTAAA	60
	GCCAGAGGAG GGGCAGGAAT GTCTGAGGTG GCAACACTTC TCTTCAGCCA GACAGCACTG	120
	GCCAGTTTGG AGTCTGTCCA TCCTGCAGGC CACAAGCTCT GGGTAAGCTG GGAATGGGCA	180
	GGGACCTTGG TGAAGGATG GTCACACCCC AGAGTGGGGT GAAGCTAAGA TGAGGGGAGG	240
10	GAGAGTATGG GTTTGAGTTT CCCTGGGCCG TCGAGGAATC CTCTGAGTCT CTGCTCCCCA	300
	AAGAAATTAAGACAATTCA TTTCTGTGCC CACGGCCCTT ATGGCTCCAC CTGCACTTCT	360
15	GCTCCCCACC CCCCAGAAAT CCTCTTAAAC CCAGAAGGTC CCAGTTTCCA GACCCTAGTC	420
	AGTATATCTG GCTCTGGGGT GAAGAGAACG GCCCCCTCTT CACCCTCAA CAGGAACCAG	480
	TGGTTGGAGG GGAGGAAGTG CCTGAGGGGA AGTTATGGGG CCCCAGATAC TCCTCCATGC	540
20	CCCACTTCAG CCCTAGCAGC ATCTGCCTGT GGAAGCAGC TCTCCACACC AGCCAAGGGG	600
	GCCCCACAC TCCCGCGCTG CTCTGCGGCT CAGGGAGCAG CCCACCTGCT GGGTGTGCTG	660
	ATATCACCTT CCCTTCTTCC CCCCAGTGCC CACACCACC CAGGCCCAGG CTCCTTCCCC	720
25	TCATCATCC COTTACCAGC ACCTAGAACC ATCCAGGGCT GAAAAGTCCC CTCCAAACCA	780
	CGTGGTCAGC CCAGGGCAGA GAAAGGGCT GGGCTCTGGA GTTGGGCAGA GCTGGCCTTA	840
30	AACCCAGCT CCACCTTCTT GGGATGGGTG ACCTAGTAAA GTCCAGGCTT GAATCTCGGG	900
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 276 406 T3

TCTTTACTTG GGCAACGGGC ACCATGATAC CCTATGTTCT GGGGATTAGC AGTGAGGAAT 960
 5 GGAAAGTGCC CAGCTCGGGT TGGCACATAA GGGAGGCTCC CCAGCCTGGG AACGATTATA 1020
 ACAGAGGGCC CCTCACTTCA CAGATGAGGA ACTTGAGGCA AGTCACCAGC CCCTGATCAT 1080
 TTCGCCTAAA AGAGCAAGGA CTAGAGTTCC TGACCTCCAG GCCAGTCCCT GATCCCTGAC 1140
 10 CTAATGTTAT CGCGGAATGA TGGTAAGTAA AGTGTCTCTT GCATCTGCAT AGAGAGAGTC 1200
 CTGGGAGCTT AGGAAGTGAT GGGGAACAGT GATGTATGCA GCTTGACAG GCCTCTGGGG 1260
 15 ACAGCTGGTA CAGGAGGGAA AGGGACCTCA CGGGAGGCC AGAAACCTGG TAAGAGGTGA 1320
 GGTATTAAGG TCTGGGATGG AGAAGCTCTG AGGGTATATT TTTCTGCCTC TAAAACCTGTT 1380
 GGAGAGGGAA TCTGAGAAAG CTGCAACCAA CCAGGAGGCT GGGGTACGCT GGAGAAGGAA 1440
 20 TGGGCTTCCT AACCTGAGC CCTCTTCCCT GAAGATATAT GTATCTACGG GGGCCTGGGG 1500
 CTGGGCGGGC TCCTGCTTCT GGCAGTGGTC CTTCTGTCCG CCTGCCTGTG TTGGCTGCAT 1560
 25 CGAAGAGGTG AGCGCTGCAC TCCCTCCCTC CCCCTGCAGC AGTGCCCCCT GTGCCCCAC 1620
 CCCCACACGC TTTCCCACTG CTTTCCCAGA ACACTGCCTG GCCCTGGAGC CACTGGGAAG 1680
 30 CCAACAGGGG AGTCCACGCC TGCTGGTGGG GGGAGCCCGG GAGGCGGGAG AAGCACAAAG 1740
 GGTGGGCTGT GTTGAGCTTC TTCTTTTCTT CCAGTAAAGA GGCTGGAGAG GAGCTGGGTG 1800
 AGTCTGGGGA CAGGGAAGGG GGAGGGCAAG AGAGATCCTG AGTGGGTGAG TGGGGAGAAG 1860
 35 CATGGCTGAG CGCTGAGAGG AGGGTTGGGG ACGGGAGACA AGGAGAGAGA AAGTAGGAGC 1920
 ATGAGAGAGG CAGAGAAAAT CGAGGCAAAA GAGAAAGAGA AAATGAGACA GAAACCAAGA 1980
 40 GAAAAAGTGA GACAGAGGAT AGGAGAGACA GGGAGAAAAT GAGAGTGAGA GAGACACAAA 2040
 GAGAAGAGCA ATGAAAGAGA GAGAGAGAGA GAGGCTCCAG AACCAAGCAC AGTGGCTCAC 2100
 45 GTCTGTCATT CCACTATCGC AAGGCTGAGG CAGGAAGATA GCTTGAGCTC AGGGGTTGAA 2160
 GACAATCCTG GACAACATAG TGGACTCTGT CTCCAAGAA AAAAGAGAGA GAGAGAGAGA 2220
 GAGAGAGAGA GGGAGAGAGA GAGAGAGAGA GGGAGAGAAG TAAGAAAGGC TGGAGGTGGG 2280
 50 AGCAGAATC ACAGGGAAGG ATCTGACGCA TCGCTCCCA TCAGCACCTT CTGTCCTGGT 2340

55

60

65

ES 2 276 406 T3

CCCAGGCCCA GGGCTCCTCA GAGCAGGAAC TCCACTATGC ATCTCTGCAG AGGCTGCCAG 2400
 5 TGCCACAGCAG TGAGGGACCT GACCTCAGGG GCAGAGACAA GAGAGGCACC AAGGAGGATC 2460
 CAAGAGCTGA CTATGCCTGC ATTGCTGAGA ACAAACCCAC CTGAGCACCC CAGACACCTT 2520
 CCTCAACCCA GGGGGGTGGA CAGGGTCCCC CTGTGGTCCA GCCAGTAAAA ACCATGGTCC 2580
 10 CCCCACCTTCT GTGTCTCAGT CCTCTCAGTC CATCTCGAGC CTCCGTTCAA ATTGATCATC 2640
 ATCAAACTT ATGTGGCTTT TTGACCTTTG AATAGGGAAT TTTTAAATT TTTTAAAAAT 2700
 15 TAAAATAAAA AAAACACATG GCTCACCTT CCACCCACTC TGGGGTCAAA TAGTAATTTG 2760
 TTGGGTGAAT GACAGTGTC AGGGACCCAA GCTCCCCTAA CAGCCAGAAG AGGGTATGTG 2820
 TGGGCCTGGC AGGAAAGGGC AGTTGCCAAG GAGGAGTCAT ATCTGATCCT TCCCATTCT 2880
 20 CAGGACAATC AGGCTCAGCC TCCTGGGACT GGGGAAGCA GATGTGCTGA GCTCCACAT 2940
 GGTGGTGGGA GGGGCGCTGG GACCACAGCC GGCAGCTGCC TTCTTGACC TTTCCAGGTC 3000
 25 AGACCTGGTG GAAGGGAAAG TTCAGAGTTG GGGGAATCCG GAGAGAGTAG ATTTGGCATC 3060
 TGGAGAATGG AGAAGAAAAC ACTTGAGACT CATGAGGAGT TAGTGGTGGG GCAGATTTAT 3120
 TGGGGTCTTT TGAAGAGGAC TAGGGACATC TGGGCTCTGG AATCACTCCT CGGGGCCCAT 3180
 CTGAGGAGTG GCAGTGTGTT CCCATGTGAC AGTGGCCTGG TCAGAGAGAG GACAGGAGCT 3240
 GCTCAGTGTT GCAGTCCCGA GGCTCTCCTC TTCCTGGTCT CTGTCCCTCC TCCTCCCACT 3300
 35 CTCTTACTGC CCTCCCATC CCGTCCACTA TTGCCCTGG CTCCATTACT CACATTTGCC 3360
 CTGGTAATAG ACGGTGCTGC CCACGGCCAC AGAGAGAAAG CTGACAGCAT AGAATCCAGC 3420
 40 CCGAAGAGGA GGACTGTACC AGCCCCCTAG CTGAGGATGT TCTGCATGGG GCAATGGAGA 3480
 CGGGGTGG GGAAGAAGTG CACACAGGCT CAGGGAGGGA AGGGCCTCA GAGGAGCATC 3540
 CCTGCCTCCC AAGGACATTG CCTCTTGGGC CTCCAGCCAG GAGGAGACAC CACCTCCAG 3600
 45 CATCTCACCT TTCTCCACCA CCAGCCGAGT CCCATTCCCT GTCCCGACAC CAAGGCCAG 3660
 CACTCCACT CTGCACACGT AGATGCCTGG CGTCATGGCC TCGCACGTCC CGGATGTGCA 3720
 50 GCTCAGCCTG GTGGTCATGG AGGAAACGGG AAGAAGCAGA TGGAGGCGGC CCTGAACTC 3780
 TGGGGTTCCA TTCTCACCT CCTTCCCTGG AACCACCTCA TCTCGGAACC ACGTGACGGA 3840
 55 GCCAATGGCC AGTCTCCCTT GGCTGGCATT GAAGGAGCAG GGCAGGAAGG CAGAGGATCC 3900

60

65

ES 2 276 406 T3

TTCCAGGGTA CGAATCTCAG GGGGCTGGGA CACCCAGAGA GCACAGGAAT CCTGGGGGGA 3960
 5 AAAGGGAGAC CCAGAGAARC AOCTCCOCAG TTATTCCAAA GAGAAAAGAC AACAGAGCTT 4020
 GGAGTAGAAC ATCCCAGCTT TCTCCAGGCA TAGGGTGCAT GGGAAATAGAT ACTTTGGGGC 4080
 CTCATTA AAC CCTTCCCTCT TAACCAATCT GATTTCCTAA CATTGCTTAT TAAATCATT 4140
 10 TTCGGCTGGG TGCAGTCGCA CGCCTGTAAT CCCAGCACTT TGGGAGGCOG AGGTGGGCGG 4200
 ATCACCAGGT CAGGAGATCG AGACCATCCT GGCCAACATG GTGAAACCCC GTCTCTACTA 4260
 15 AAAAAATACA AAANTTAGCC GGGCATGGTG GTGTGCACCT GTAATCCCAG CFACTCGGGA 4320
 GGCTGAGGCA GGAGAARTCGC TTGAACCCGG GAGGCAGAGG TTGCAGTGAG CCAAGATTGC 4380
 GCCATTGCAC TCCAGCCTGG GCGACAAAGC AAGACTCCAT CTCAAAAAAT AAAAAATAAA 4440
 20 AATCATTTTT CAAATTCTTC CTATACCAAC TCTCACTCTC ACCCTCTGCC ATCATTCTCC 4500
 AGCCAGTTCA GTAGTAACTT GTCTAGCTGA AATGTAACC ATCATGGTGA AATTAAGCTC 4560
 25 ATTAATGAAT TGCAGCTGCC TAGTTAACTA ATATCACTCA TTATATTATG CAGGTATTAT 4620
 TTTAGTACAA ATGGCATTGT ACAGTAAGCC ATCCTTCCFC TTTTCTTTT TTCTTTTTT 4680
 30 GAGATGGGGT CTTGCTCTGT TGCCAGGCT GGAATGCAGT GGTGCAATCT TGGCTCACTG 4740
 CAAACTCCGT CCCCTGGGTT CAAGCGATCC TGGTGCCCTCA GCCTCCCAAG TAGCTGGGAC 4800
 TACAGGCACC CACCACCACG ACTGGCTAAT TTTTGTATTT TCAGTCGAGA CAGGGTTTCC 4860
 35 ACCATCTGGT CTCAAACTCC TGACCTCAAG TGATCCACCC AOCTCGGACC AGGCTGGCTC 4920
 AAACCTCTGA TCTCAAGTGA TCCACCTGCC TCGGCCTCCC AAAGTGCCAC CCAGCCACTC 4980
 40 TTGGTTTTCG TTRAAGAAAG TAACTAATTA AATCTCCAGG TGAAGAOGTG GCCTTAATTG 5040
 GTTGAGATTC CTATTTAACC CGTCCATGTT GATGAATTAA ACCAAATATT AAAATCCCTG 5100
 ATTAATAT CTACTTAGGG AAATTTACAA GTCATTCTAT TTCAGTGGTT CTCAAACTTG 5160
 45 AGTGTGTATG GAAATTACCT GGAGCATCTG CTAGAACAGA TTCCTGGGCC TACCCCCGA 5220
 GTTTTTGACT CAGTAGGTCT GGAGTGGGGC CTAAGAATTT GTTCTAGGTT CCCAGAAATC 5280
 50 CACATTTTGA GAACTCCTGC ATTTAGTTAA TAATATGCCT GATAGTTAAG GTCTCTCAGT 5340
 TCATTA AAAA CAGTTTCGGC CGGGTGCAGT TCGCACGCCT ATAATCCCAA CACTTTGGGA 5400
 55 GGCCAAGGCG AGTGGATCAC CTGAGGTCAG GAGTTTGAGA CCAGCCTGGC CAACATGGTG 5460
 AAACCTCGTC TCTACTAAAA ATACACAAGT TAGCCAGCAG TAATGGCATG CACCTGTAAT 5520
 CCTAGCTACT TGGGAGGCTG AGACAGGAGA ATCATTITTA CCCAGGAGGT GGAGGCTGCA 5580
 60 G 5581

65 (2) INFORMACIÓN DEL ID. de SEC. núm.: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 276 406 T3

1 Met Leu Ser Arg Asn Asp Asp Ile Cys Ile Tyr Gly Gly Leu Gly Leu
 5 Gly Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Cys
 10 Trp Leu His Arg Arg Val Lys Arg Leu Glu Arg Ser Trp His Leu Leu
 15 Ser Trp Ser Gln Ala Gln Gly Ser Ser Glu Gln Glu Leu His Tyr Ala
 20 Gly Arg Asp Lys Arg Gly Thr Lys Glu Asp Pro Arg Ala Asp Tyr Ala
 25 Cys Ile Ala Glu Asn Lys Pro Thr

(2) INFORMACIÓN DEL ID. de SEC. núm.: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 97 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGY: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. de SEC. núm. : 4:

1 Met Leu Ser Arg Asn Asp Asp Ile Cys Ile Tyr Gly Gly Leu Gly Leu
 5 Gly Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Val Leu Leu Ser Ala Cys Leu Cys
 10 Trp Leu His Arg Arg Val Lys Arg Leu Glu Arg Ser Trp Ala Gln Gly
 15 Ser Ser Glu Gln Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Gln Arg Leu Pro Val
 20 Pro Ser Ser Glu Gly Pro Asp Leu Arg Gly Arg Asp Lys Arg Gly Thr
 25 Lys Glu Asp Pro Arg Ala Asp Tyr Ala Cys Ile Ala Glu Asn Lys Pro
 30 Thr