

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 413**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08730578 .5**
96 Fecha de presentación: **22.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2140021**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **Procedimientos para detectar la enfermedad inflamatoria del intestino**

30 Prioridad:
22.02.2007 US 891196 P
13.11.2007 US 987752 P
28.01.2008 US 24170

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2012

72 Inventor/es:
DIEHL, Lauri;
FLANAGAN, Kenneth y
MO, Lian

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2012

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 379 413 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

Procedimientos para detectar la enfermedad inflamatoria del intestino

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a perfiles de expresión génica en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino. Este descubrimiento encuentra uso en la detección y diagnóstico de la enfermedad inflamatoria del intestino

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), un trastorno inflamatorio crónico del tracto intestinal padecido por aproximadamente un millón de pacientes en los Estados Unidos, se compone de dos grupos de enfermedades principales: colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD). En ambas formas de IBD, los microbios intestinales pueden iniciar la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles. La UC está restringida a menudo al colon, mientras que la CD se produce normalmente en el íleo del intestino delgado y en el colon. (Podolsky, D.K., N. Engl. J. Med. 347:417-429 (2002). Los perfiles de expresión génica de tejidos de pacientes de IBD han proporcionado algunas evidencias de las posibles dianas para la terapia y/o el diagnóstico (véanse, por ejemplo, Dieckgraefe, B.K. y col., Physiol. Genomics 4: 1-11 (2000); Lawrance I.C. y col., Hum Mol Genet. 10: 445-456 (2001); Dooley T.P. y col., Inflamm. Bowel Dis. 10: 1-14 (2004); y Uthoff S.M., Int J Oncol. 19: 803-810 (2001)). Investigaciones adicionales de la desregulación génica en pacientes que experimentan la enfermedad inflamatoria del intestino incluyen, por ejemplo, Lawrance, I.C. y col., cuyos perfiles de expresión génica distintivos se dieron a conocer para algunos genes en la UC y la CD (Lawrance, I.C. y col., Human Mol. Genetics 10(5): 445-456 (2001)). Uthoff, S.M.S. y col., han dado a conocer la identificación de genes candidatos para la UC y la CD usando el análisis de la micromatriz (Uthoff, S.M.S. y col., Int'l. J. Oncology 19: 803-810 (2001)). Dooley, T.P. y col. han dado a conocer la correlación de la expresión génica en la IBD con tratamiento con fármacos para el trastorno (Dooley, T.P. y col., Inflamm. Bowel Dis. 10(1): 1-14 (2004).

[0003] Existe la necesidad de identificar marcadores biológicos adicionales de la enfermedad inflamatoria del intestino para uso en el diagnóstico de esta enfermedad crónica. La presente divulgación cubre esta necesidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva el hallazgo único de que los miembros de la superfamilia de genes LY6 están regulados en exceso en la superficie de las células epiteliales intestinales (IEC) en modelos de colitis de murino y en tejido intestinal de pacientes humanos que experimentan IBD, cuyos genes no se expresan en IEC sanas. La mayoría de los miembros de la familia LY6 son glicoproteínas superficiales celulares ancladas por GPI con una amplia distribución en células de origen hematopoyético y una expresión más limitada en células no hematopoyéticas. Aunque ampliamente usados como marcadores de diferenciación de células inmunes (Sunderkotter, C. y col., J. Immunol. 172: 4410-4417 (2004)), las funciones que la familia LY6 posee han sido difíciles de elucidar (Shevach, E.M. y P.E. Kerty, Immunol. Today 10: 195-200 (1989)). Los informes han demostrado que las moléculas LY6 están implicadas en una gama diversa de funciones que incluyen la activación de linfocitos T (Zhang, Z.X. y col., Eur. J. Immunol. 32: 1584-1592 (2002) y Henderson, S.C. y col., J. Immunol. 168: 118-126 (2002), olfato (Chou, J.H. y col., Genetics 157: 211-224 (2001) y adhesión celular (Jaakkola, I. y col., J. Immunol. 170: 1283-1290 (2003)).

[0005] En el sentido más amplio, la invención proporciona un procedimiento de detección del aumento de expresión de genes de la familia de genes LY6 humanos en células o tejido gastrointestinal inflamado procedente de un primer mamífero que experimenta enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) con respecto a un mamífero del control. En un sentido más directo, se espera que el procedimiento sea aplicable al diagnóstico de la IBD, IBD asociada con la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5, tal como colitis ulcerosa (UC) y Enfermedad de Crohn (CD). El procedimiento de la invención es útil para detectar respondedores y no respondedores a tratamiento terapéutico de la IBD. En una posible realización, la IBD es colitis ulcerosa (UC). La IBS puede ser Enfermedad de Crohn (CD). En una realización, el tejido gastrointestinal es tejido de colon tal como colon sigmoideo. En una realización, la expresión génica de LY6H, LYPD1, LYPD23 y/o LYPD5 aumenta en tejido gastrointestinal (tal como tejido de colon) en una IBD, CD o UC. En una realización, el gen LY6H comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y codifica el polipéptido de LY6H que comprende la SEQ ID NO: 2. En una realización, el gen LYPD1 comprende el ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 3 o 4 y codifica el polipéptido LYPD1 que comprende la SEQ ID NO: 5. En una realización, el gen LYPD3 comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 y codifica el polipéptido LYPD3 que comprende la SEQ ID NO: 7. En una realización, el gen LYPD5 comprende el ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 8 o 9 y codifica el polipéptido LYPD5 que comprende la SEQ ID NO: 10.

[0006] En una realización, el procedimiento de la invención comprende obtener una muestra de tejido gastrointestinal procedente de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal, poner en contacto el tejido con un agente detectable que interactúa con la proteína LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o con

ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y determinar el nivel de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 con respecto a un tejido de control. En una realización, el aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 con respecto al control es indicativo de IBD en el mamífero de prueba. En una realización, el aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el tejido gastrointestinal de prueba con respecto al tejido gastrointestinal de control es indicativo de UC en el mamífero de prueba. En una realización, el tejido o las células procedentes de la prueba y del mamífero del control son del colon.

[0007] En una realización, la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 se determina mediante la detección de la expresión génica, tal como mediante la detección del ARNm que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido o células procedente del tracto gastrointestinal. En una realización, una muestra del control es una muestra de tejido o células del mismo tejido o tipo de células obtenidos de un mamífero conocido que no está experimentando un trastorno gastrointestinal, tal como IBD, UC o CD. En una realización, una muestra del control es un patrón universal que comprende ARN procedente de algunos tejidos normales o de múltiples líneas celulares. En análisis de micromatrices, tales patrones universales son útiles para vigilar y controlar la variación intra e interexperimental. En una realización, un patrón universal (o ARN de Referencia Universal (URR) se prepara tal como se proporciona por Novoradovskaya, N. y col., (2004) BMC Genomics 5: 20. En una realización, para uso como un control en el análisis de la micromatriz de ARN de ratón, el URR es un ARN de Referencia de Ratón Universal de Stratagene (nº de catálogo 740100, Stratagene®, La Jolla, CA.). En una realización, para uso como un control en un análisis de micromatriz de ARN humano, el URR es un ARN de Referencia Humano Universal de Stratagene® (nº de catálogo 740000). En una realización, para uso como un control en el análisis de la micromatriz de ARN de rata, el URR es un ARN de Referencia de Rata Universal de Stratagene® (nº de catálogo 740200). En una realización, en la que el ARN es ARN de ratón, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de embriones, fibroblastos de embriones, riñón, hepatocitos de hígado, macrófagos alveolares de pulmón, linfocitos B, linfocitos T (timo), glándulas mamarias, mioblastos de músculos, piel, y testículos. En una realización, en la que el ARN es ARN humano, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de adenocarcinoma de glándula mamaria, hepatoblastoma de hígado, adenocarcinoma de cuello de útero, carcinoma embrionario o de testículos, glioblastoma de cerebro, melanoma, liposarcoma, linfoma histiocítico (macrófagos, histiocitos), leucemia linfoblástica de linfoblastos T, melanoma plasmacitoma de linfocitos B. En una realización en la que el ARN es ARN de rata, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de leucemia basófila de la sangre, linfoma de linfocitos T de la sangre, hibridoma de linfoblastos B de la sangre, glioma cerebral, carcinoma embrionario de saco vitelino, fibroblasto embrionario normal, riñón normal, hepatoma de hígado, macrófago alveolar normal pulmonar, tipo II alveolar normal pulmonar, adenocarcinoma de glándula mamaria, mioblastos de músculo, piel normal, tumor de células de Leydig de los testículos.

[0008] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia contenida en el interior del recipiente, en el que la composición de materia comprende un ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o sus complementos, y/o un anticuerpo o anticuerpos dirigido(s) contra LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y/o uno de sus fragmentos de unión dirigido contra LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, en el que los ácidos nucleicos y/o los anticuerpos son detectables. La composición de la materia puede comprender detectar agentes para detectar la unión al ácido nucleico, tales como, sin limitación, los ácidos nucleicos que codifican LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o sus complementos, para el ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal. La composición de materia puede comprender detectar agentes para detectar la unión del anticuerpo a, por ejemplo, LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal. El anticuerpo de la composición puede ser marcado de manera detectable. El anticuerpo de la composición es detectable mediante un segundo anticuerpo, cuyo segundo anticuerpo es detectable o marcado de manera detectable. El artículo puede comprender opcionalmente además una marca prefijada al recipiente, o un envase insertado incluido con el recipiente, que se refiere al uso del ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o su complemento y/o al anticuerpo dirigido contra LY6H, dirigido contra LYPD1, dirigido contra LYPD3 y/o dirigido contra LYPD5 o uno de sus fragmentos de unión a LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en la detección del aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido intestinal, incluyendo sin limitación, tejido de colon. El trastorno intestinal puede ser tal como UC o CD. El polipéptido LYPD1 y el anticuerpo dirigido contra LYPD1 pueden ser un anticuerpo tal como se da a conocer en los documentos US7. 157.558 y US7. 144.990, respectivamente.

[0009] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva un procedimiento para diagnosticar la presencia de un trastorno intestinal en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (a) en una muestra de ensayo de tejido o células obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra del control de células normales conocidas procedentes de un mamífero que no experimenta un trastorno intestinal del mismo origen o tipo de tejido, en el que un nivel mayor de expresión del polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra del control, es indicativo de la presencia de un trastorno intestinal en el mamífero a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo. El trastorno intestinal puede ser IBD tal como UC o CD. La detección puede ser poniendo en contacto un anticuerpo con el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, o un fragmento de unión del anticuerpo, con las muestras de ensayo y del control y determinar la cantidad relativa de formación del complejo anticuerpo-polipéptido.

Un nivel mayor de formación del complejo anticuerpo-polipéptido en la muestra de ensayo con respecto a la muestra del control es indicativo de trastorno intestinal, tal como IBD, UC o CD, en el mamífero de prueba. El anticuerpo puede ser marcado de manera detectable o, alternativamente, el anticuerpo se detecta mediante la posterior unión de un segundo anticuerpo que es detectable.

5

[0010] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva un procedimiento para diagnosticar la presencia de un trastorno intestinal en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende tejido o células obtenidas a partir del mamífero de prueba con un oligonucleótido que se hibrida con un rigor alto al ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (o su complemento) o un anticuerpo que se une de manera específica al polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y (b) detectar la formación de un complejo entre el oligonucleótido o el anticuerpo y el ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (o su complemento) o el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, respectivamente, en la muestra de ensayo, en el que la formación de la mayoría de dicho complejo en la muestra de ensayo con respecto a una muestra del control es indicativa de la presencia de un trastorno intestinal (tal como IBD, UC o CD) en el mamífero de prueba. El trastorno intestinal puede ser IBD tal como UC o CD. El tejido de los mamíferos de prueba y del control puede ser tejido de colon. Opcionalmente, el anticuerpo de unión al polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o el oligonucleótido que hibrida el gen LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 empleado mediante el procedimiento de la invención es detectable, marcado de manera detectable, unido a un soporte sólido, o similar, y/o la muestra de ensayo de tejido o células se obtiene a partir de un individuo sospechoso de experimentar un trastorno intestinal, en el que el trastorno es IBD, tal como, sin limitación, UC o CD.

[0011] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva el uso de (a) un polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, (b) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o un vector o célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de (a), (c) un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, o (d) un oligopéptido de unión a LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, en la preparación de un medicamento útil para la detección diagnóstica de un trastorno intestinal, incluyendo sin limitación, IBD CD o UC, en un tejido intestinal de un mamífero, incluyendo sin limitación tejido de colon.

[0012] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva un procedimiento para detectar una respuesta terapéutica a un fármaco en un mamífero tratado con un agente terapéutico de IBD, en el que el procedimiento comprende determinar la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido gastrointestinal de un mamífero de prueba con respecto a un tejido gastrointestinal del control de un mamífero del control, en el que un mayor nivel de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en un tejido de ensayo con respecto a un tejido del control indica un estado de enfermedad o la continuación del estado de enfermedad. Una diferencia en la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el tejido de prueba que no sea significativamente mayor que la de los niveles de expresión del control normales o que esté comprendida dentro de un intervalo de niveles de expresión normales para LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una población de mamíferos indica la mejora o la resolución del trastorno intestinal, cuya mejora o resolución se puede atribuir al agente terapéutico. Una respuesta terapéutica se determina cuando los niveles de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido gastrointestinales o de colon o células del mamífero tratado con un agente terapéutico son diferentes (la expresión es más similar al control normal, es decir, los niveles de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 son inferiores de los niveles de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el mamífero antes del tratamiento).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45

[0013] Las **Figuras 1A y 1B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica el polipéptido de LY6H humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6H humano (SEQ ID NO: 2).

[0014] Las **Figuras 2A y 2B** representan gráficamente las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NOS: 3 y 4) que codifican el polipéptido LYPD1 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD1 humano que se muestra en la Figura 2C (SEQ ID NO: 5).

[0015] Las **Figuras 3A y 3B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 6) que codifica el polipéptido LYPD3 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD3 humano (SEQ ID NO: 7).

55

[0016] Las **Figuras 4A y 4B** representan gráficamente las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NOS: 8 y 9) que codifican el polipéptido LYPD5 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD5 humano que se muestra en la Figura 4C (SEQ ID NO: 10).

[0017] Las **Figuras 5A y 5B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 11) que codifica el polipéptido de LY6D humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6D humano (SEQ ID NO: 12).

[0018] Las **Figuras 6A y 6B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 13) que codifica el polipéptido de LY6E y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6E humano (SEQ ID NO: 14).

65

- [0019]** Las **Figuras 7A y 7B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 15) que codifica el polipéptido LYPD2 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD2 humano (SEQ ID NO: 16).
- 5 **[0020]** Las **Figuras 8A-8H** representan gráficamente las secuencias de moléculas GLG-1 (ESL-1): (A-B) N° de Acceso U64791, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 17) que codifica el polipéptido GLG-1 (ESL-1) (SEQ ID NO: 18); (C-D) N° de Acceso NM_012201, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 19) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 20); (E-F) N° de Acceso AK 172806, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 21) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 22); y N° de Acceso AK131501, secuencia de
10 ácido nucleico (SEQ ID NO: 23) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 24).
- [0021]** Las **Figuras 9A y 9B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 25) que codifica el polipéptido de LY6A de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6A de murino (SEQ ID NO: 26).
15
- [0022]** Las **Figuras 10A y 10B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 27) que codifica el polipéptido de LY6C de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6C de murino (SEQ ID NO: 28).
- 20 **[0023]** Las **Figuras 11A y 11B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 29) que codifica el polipéptido de LY6D de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6D de murino (SEQ ID NO: 30).
- [0024]** Las **Figuras 12A y 12B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 31) que
25 codifica el polipéptido de LY6E de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6E de murino (SEQ ID NO: 32).
- [0025]** Las **Figuras 13A y 13B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 33) que
30 codifica el polipéptido de LY6F de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6F de murino (SEQ ID NO: 34).
- [0026]** Las **Figuras 14A y 14B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 35) que codifica el polipéptido de LY6K de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6k de murino (SEQ ID NO: 36).
35
- [0027]** Las **Figuras 15A y 15B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 37) que codifica el polipéptido de LY6K de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6k de murino (SEQ ID NO: 38).
- 40 **[0028]** Las **Figuras 16A y 16B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 45) que codifica el polipéptido LYPD3 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD3 de murino (SEQ ID NO: 46).
- [0029]** Las **Figuras 17A y 17B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 47) que
45 codifica el polipéptido de LY6H de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6H de murino (SEQ ID NO: 48).
- [0030]** Las **Figuras 18A y 18B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 49) que
50 codifica el polipéptido LYPD1 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD1 de murino (SEQ ID NO: 50).
- [0031]** Las **Figuras 19A y 19B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 51) que
55 codifica el polipéptido LYPD2 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD2 de murino (SEQ ID NO: 52).
- [0032]** Las **Figuras 20A y 20B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 53) que
60 codifica el polipéptido de LY6g5c de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6g5c de murino (SEQ ID NO: 54).
- [0033]** Las **Figuras 21A y 22B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 55) que
65 codifica el polipéptido de LY6g6c de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6g6c de murino (SEQ ID NO: 56).
- [0034]** Las **Figuras 22A y 22B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 57) que
65 codifica el polipéptido SLURP2/LYNX1 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido SLURP2/LYNX1 de murino (SEQ ID NO: 58)

- [0035]** La **Figura 23** muestra que los miembros de la familia LY6 están regulados en exceso en IEC en modelos de colitis en murino. Se aislaron las IEC del modelo de colitis IL10^{-/-} (Figura 23A) y el de transferencia de CD45RB^{HI} (Figura 23B) mediante LCM y se purificó el ARN. Se llevó a cabo el análisis de la micromatriz y se analizó tal como se describe en los Ejemplos. Los números representan el promedio del cambio de plegado en comparación con el ARN estándar universal de ratones colícticos sobre ratones sanos. Los números por debajo de la cartografía térmica indican la puntuación de inflamación del ratón individual.
- [0036]** Las **Figuras 24A-24D** muestran que la expresión superficial de las moléculas LY6 está regulada en exceso en IEC en el modelo IL10^{-/-} de colitis. Ratones silvestres (Figura 24A) o IL10^{-/-} (Figura 24B) se tiñeron para la expresión superficial de LY6A (verde, con color de contraste DAPI). De manera similar, ratones silvestres (Figura 24C) o IL10^{-/-} (Figura 24D) se tiñeron para la expresión superficial de LY6C.
- [0037]** Las **Figuras 25A-25I** muestran que la expresión superficial de LY6A y LY6C está regulada en exceso en respuesta a citocinas inflamatorias, particularmente IFN γ . Células YAMC se trataron con la citocina indicada durante 15 horas y se tiñeron para la expresión superficial de LY6C (Figura 25A) y LY6A (Figura 25B). Se cultivaron células YAMC durante 15 horas en presencia de dosis crecientes de IFN γ y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 25C) y LY6A (Figura 25D). Se recogieron células YAMC estimuladas con IFN γ en diversos momentos de tiempo, tal como se indica, y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 25E) y LY6A (Figura 25F). IL-22 reguló en exceso la expresión de LY6C (Figura 25G) y LY6A (Figura 25H). Los niveles de LY6A y LY6c estuvieron regulados en exceso en la línea IEC de murino, CMT93 en respuesta al tratamiento con IFN γ (Figura 25I).
- [0038]** **Figuras 26A-26E.** El agotamiento de balsas lipídicas dio como resultado una inhibición de la producción de quimiocina medida por LY6C. Se incubaron células YAMC con colesterol agotado (barras oscuras) o no agotado (barras abiertas) con nati-KLH o anti-LY6C unido a placa tal como se indicó durante 15 horas. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7 (Figuras 26A-26C) Los niveles superficiales de LY6A (Figura 26D) y LY6C (Figura 26E) disminuyeron en respuesta al agotamiento del colesterol
- [0039]** Las **Figuras 27A-27D** muestran que la reticulación de LY6C, pero no la de LY6A, induce la regulación en exceso de la expresión superficial de LY6A y LY6C. Se incubaron células YAMC durante 24 horas en placas revestidas con anti-KLH del control, anti-LY6A o anti-LY6C y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 27A) o LY6A (Figura 27B). Se pretrataron las células durante 12 horas con 100 U/ml de IFN γ y se plaquearon de manera similar en placas revestidas de anticuerpo y se analizaron para la expresión de LY6C (Figura 27C) o LY6A (Figura 27D).
- [0040]** Las **Figuras 28A-28C** muestran que la reticulación de LY6C, pero no la de LY6A, induce la secreción de quimiocinas. Figura 28A: Se preincubaron células YAMC o no, tal como se indica, con 100 U/ml de IFN γ durante 15 horas y se cultivaron en placas revestidas con 10 μ g/ml de anti-LY6A (barras negras) o anti-LY6C (barras sombreadas) o anti-KLH del control (barras abiertas). Se aisló el ARN a las 24 (izquierda), 48 (centro) y 72 (derecha) horas y se analizó para la expresión de CXCL5 o CCL7 (A). Los datos indican el promedio \pm DE del cambio de plegado (tal como se determinó mediante el procedimiento 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}) en comparación con células reticuladas isotópicas no tratadas. Figura 28B: Se recogieron los sobrenadantes a las 48 horas en las células reticuladas, como anteriormente, con 1, 5 o 10 μ g/ml (tal como se indica) de secreción de anticuerpo y se determinó la secreción de CXCL5 en el sobrenadante mediante ELISA, * $<0,05$. Figura 28C: Disminuyeron los niveles de CXCL5 y CXCL2 en respuesta a la reticulación de LY6C cuando los niveles de LY6C se inactivaron con ARNip.
- [0041]** Las **Figuras 29A-29B** muestran que las IEC en colitis poseen un modelo de expresión génica de la quimiocina similar. Se aislaron IEC en el modelo de colitis IL10^{-/-} (Figura 29A) y en el de transferencia de CD45RB^{HI} (Figura 29B) mediante LCM y se purificó el ARN. Se llevó a cabo el análisis de la micromatriz y se analizó tal como se describe en los Ejemplos. Los números representan el promedio del cambio del plegado en comparación con el ARN estándar universal de ratones colícticos sobre ratones sanos. Los números por debajo de la cartografía térmica indican la puntuación de la inflamación del ratón individual.
- [0042]** Las **Figuras 30A-30C** muestran que la expresión de los genes de la familia LY6 humana están regulados en exceso en las células de colon tratadas con citocinas. Células colo-205 humanas se trataron con las citocinas indicadas, o combinaciones de citocinas, durante 18 o 24 horas. Se muestra el aumento de plegado en la expresión de LY6H humano (Figura 30A), LYPD3 humano (Figura 30B), y LYPD5 humano (Figura 30C) con respecto a la β -actina del control.
- [0043]** Las **Figuras 31A-31B** muestran que los pacientes con Enfermedad de Crohn tienen elevados niveles de LYPD1 (Figura 31A) y LYPD5 (Figura 31B) en el colon. Se obtuvieron muestras de tejido de pacientes de IBD humana y se determinó la expresión génica de LYPD1 y LYPD5. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de LYPD1 y LYPD5 en tejidos inflamados de pacientes de CD. Se observó también un aumento estadísticamente significativo de LYPD5 en tejidos inflamados de pacientes de UC. Los valores

del eje Y reflejan la expresión génica con respecto a un patrón de ARN universal.

[0044] Las **Figuras 32A y 32B** muestran (A) células COS sin transfectar, y (B) células COS transfectadas con el polipéptido GLG-1 (ESL-1) y teñidas con la proteína LYPD5-Fc.

5

[0045] La **Figura 33A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 33B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5.

10 **[0046]** La **Figura 34A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 34B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5.

15 **[0047]** La **Figura 35A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 35B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5

20 **[0048]** Las **Figuras 36A y 36B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 68) que codifica la integrina humana, beta 7, y la secuencia de aminoácidos del polipéptido beta 7 de la integrina humana (SEQ ID NO: 69).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición

25

[0049] “Enfermedad Inflamatoria del Intestino” o “IBD” se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva para referirse a las enfermedades del intestino que producen inflamación y/o ulceración e incluye, sin limitación, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

30 **[0050]** La “enfermedad de Crohn (CD)” o la “colitis ulcerosa (UC)” son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino de etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar cualquier parte del intestino. La característica más destacada de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento edematoso granular púrpura rojizo de la pared del intestino. Con el desarrollo de la inflamación, estos granulomas pierden a menudo sus bordes circunscritos y se integran con el tejido que los rodea. La diarrea y la obstrucción del
35 intestino son las características clínicas predominantes. Como con la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn no se cura mediante la resección del segmento de intestino implicado. La mayor parte de los pacientes con enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún momento, pero son frecuentes las recaídas posteriores y es normal el tratamiento médico continuo.

40 **[0051]** La enfermedad de Crohn puede implicar cualquier parte del tracto alimentario desde la boca al ano, aunque normalmente aparece en las regiones ileocólica, del intestino delgado o colónica anorrectal. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta por granulomas continuos, abscesos en la cripta, fisuras y úlceras aftosas. El infiltrado inflamatorio está mezclado, constituido por linfocitos (linfocitos T y B), células plasmáticas, macrófagos, y neutrófilos. Existe un aumento desproporcionado en las células plasmáticas que secretan IgM e IgG, macrófagos y
45 neutrófilos.

[0052] Los fármacos antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) son útiles para tratar la enfermedad de Crohn colónica poco activa y se prescriben comúnmente para mantener la remisión de la enfermedad. Metroidazol y ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente
50 útiles para tratar la enfermedad perianal. En los casos más graves, los corticoesteroides son eficaces en el tratamiento de las exacerbaciones activas y pueden incluso mantenerse hasta la remisión. Azatioprina y 6-mercaptopurina se han mostrado satisfactorios en pacientes que requieren la administración crónica de corticoesteroides. Es también posible que estos fármacos puedan jugar un papel en la profilaxis a largo plazo. Desafortunadamente, existe un retraso muy largo (de hasta seis meses) antes del comienzo de la acción en algunos
55 pacientes.

[0053] Los fármacos antidiarreicos pueden proporcionar también alivio sintomático en algunos pacientes. La terapia nutricional o la dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir la mejora de la enfermedad aguda, pero no inducen remisiones clínicas sostenidas. Se usan antibióticos en el tratamiento
60 secundario del crecimiento en exceso bacteriano en el intestino delgado y en el tratamiento de complicaciones piógenas.

[0054] La “colitis ulcerosa” (UC) afecta al intestino grueso. El curso de la enfermedad puede ser continuo o con recaídas, leves o graves. La lesión más temprana es una infiltración inflamatoria con formación de abscesos en la
65 base de las criptas de Lieberkühn. La coalescencia de estas criptas distendidas y rotas tiende a separar la mucosa que las cubre de su suministro de sangre, lo que conduce a la ulceración. Los síntomas de esta enfermedad

incluyen la aparición de cólicos, dolor abdominal inferior, sangrado rectal, y frecuente, heces sueltas constituidas principalmente por sangre, pus y moco, con escasas partículas fecales. Puede necesitarse una colectomía total para la colitis aguda, grave o crónica, sin remisión

- 5 **[0055]** Las características clínicas de la UC son muy variables, y el comienzo puede ser gradual o súbito, y puede incluir diarrea, tenesmo y sangrado rectal recurrente. Con implicación rápida de todo el colon, se puede producir una emergencia con riesgo para la vida, el megacolon tóxico. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, pioderma gangrenoso, uveítis y eritema nudoso.
- 10 **[0056]** El tratamiento de la UC incluye sulfasalazina y fármacos que contienen salicilato relacionados para casos leves y fármacos corticoesteroides en casos graves. La administración tópica tanto de salicilatos como de corticoesteroides es algunas veces eficaz, particularmente, cuando la enfermedad está limitada al intestino distal, y se asocia con pequeños efectos secundarios en comparación con el uso sistémico. Las medidas de apoyo, tales como la administración de hierro y de agentes antidiarreicos están indicadas en algunos casos. Se prescriben
- 15 también algunas veces azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato para uso en casos refractarios dependientes de corticoesteroides.

[0057] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “miembro de la familia de genes LY6” o “miembro de la superfamilia de genes LY6” se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva para referirse a un gen que

20 tiene homología con los miembros de la familia de genes LY6, la mayoría de cuyos miembros de la familia de genes son glicoproteínas superficiales celulares ancladas a GPI con amplia distribución en células de origen hematopoyético y expresión más limitada en células no hematopoyéticas. Los miembros de esta familia de genes se usan como marcadores de la diferenciación de células inmunes (Sunderkotter, C. y col., J. Immunol. 172: 4410-4417 (2004)). Se han examinado los genes de la familia LY6 (Shevach, E.M. y P.E. Korty, Immunol. Today 10: 195-200

25 (1989)) y las funciones incluyen la activación de los linfocitos T (Zhang, Z.X. y col., Eur. J. Immunol. 32: 1584-1592 (2002) y Henderson, S.C. y col., J. Immunol. 168: 118-126 (2002), olfato (Chou, J.H. y col., Genetics 157: 211-224 (2001) y adhesión celular (Jaakkola, I. y col., J. Immunol. 170: 1283-1290 (2003)). Los miembros de la familia de genes LY6 incluyen, sin limitación, miembros de la familia de genes LY6 de mamíferos, tales como los genes de la familia LY6 de ratón o ser humano. Tal como se usa aquí, “gen LY6” se refiere a un miembro de la familia de genes

30 LY6 y “polipéptido de LY6” se refiere al polipéptido codificado por un gen LY6. Los miembros de la familia de genes LY6 de murino incluyen, sin limitación, LY6A (NM_010738, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 26), LY6C (mM_010741, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27, que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 28); LY6D (NM_003695, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 29 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 30), LY6E (mM_002346, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 31 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 32),

35 LY6F (NM_008530, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 33 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 34), LY6I (NM_020498, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 35 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 36), y LY6K (NM_017527, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 37 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 38. Los miembros de la familia de genes LY6 humano incluyen, sin limitación, LY6H (NM_002347, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2), LYPD1 (NM_144586, ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 3 o 4 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 5), LYPD3 (NM:014400, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 7), LYPD5 (NM_182573, ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 8 o 9 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 10), LY6D (NM_003695, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 12), LY6E (NMNM_002346, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 14), LYPD2 (NM_205545, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 16). En las

45 realizaciones, el polinucleótido de cada miembro de la familia de genes LY6 dado a conocer en la presente memoria descriptiva comprende al menos 15, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1250, al menos 1500, al menos 1750, al menos 2000, o al menos 2040 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57, o el polinucleótido miembro de la familia de genes LY6 comprende las SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13,

50 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57. En una realización, un polinucleótido que se une a un polinucleótido miembro de la familia de genes LY6 (SEQ ID NOS; 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57), o uno de sus fragmentos, tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o u 100 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de LY6 o uno de sus fragmentos. En una realización, el polipéptido miembro de la

55 familia de genes LY6 comprende al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, o al menos 325, al menos aminoácidos contiguos de las SEQ ID NOS: NOS: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58, o el polipéptido miembro de la familia de genes LY6 comprende las SEQ ID NOS: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58.

60 **[0058]** Un “polipéptido de secuencia natural” de cualquiera de los miembros de la familia de genes LY6 comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido miembro de la familia de genes LY6 correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos LY6 de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido de LY6

65 de secuencia natural” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido de LY6 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes que se

producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente de corte y empalme) y las variantes alélicas que se producen naturalmente del polipéptido. En un aspecto específico, los polipéptidos LY6 de secuencia natural dados a conocer en la presente memoria descriptiva son polipéptidos de secuencia natural maduros o de longitud completa que corresponden a las secuencias en las Figuras 1-7 y las SEQ ID NOS: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 5 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58.

[0059] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, una “variante del polipéptido de LY6” significa un polipéptido de LY6, preferiblemente, sus formas biológicamente activas, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con una
10 secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, y sus formas variantes que carecen del péptido señal, un dominio extracelular, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa tal como se referencia en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polipéptidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o se eliminan uno o más restos de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos
15 natural de longitud completa. En un aspecto específico, dichas variantes de polipéptidos tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, para un polipéptido de secuencia del polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa, tal como se da a conocer en la presente memoria
20 descriptiva, y sus formas variantes que carecen de un péptido señal, un dominio extracelular, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva.

[0060] “Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” con respecto a la secuencia de polipéptido
25 de LY6 identificada en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de LY6 específica, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y de no considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de
30 aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para conseguir la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los objetivos de la
35 presente memoria descriptiva, sin embargo, % de valores de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo del programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 ha sido autorizado por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la Tabla 1 siguiente ha sido completado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C.,
40 20559, en la que se ha registrado con el U.S. Copyright Registration N°. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se configuran mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

[0061] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva “polinucleótido variante LY6” o “secuencia de ácido nucleico variante de LY6”, o “gen LY6” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido miembro de la familia del gen LY6, preferiblemente, sus formas biológicamente activas, tal como se define en la presente memoria descriptiva, y que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de
50 ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa identificada en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia del polipéptido de LY6 de longitud completa respectiva tal como se identifica en la presente memoria descriptiva (tal como la codificada por un ácido nucleico un ácido nucleico que representa solo una porción de la secuencia de codificación completa de un polipéptido de LY6 de longitud completa). Ordinariamente, dichas
55 variantes de polinucleótidos tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa respectiva o cualquier otro fragmento de la secuencia del polipéptido de LY6 de longitud completa
60 respectiva identificada en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polinucleótidos no abarcan la secuencia de nucleótidos natural.

[0062] Ordinariamente, dichas variantes de polinucleótidos varían al menos aproximadamente en 50 nucleótidos de longitud desde el polipéptido de la secuencia natural, alternativamente, la varianza puede ser al menos
65 aproximadamente de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330,

340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto, el término “aproximadamente” significa la longitud de la
5 secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia más o menos un 10 % de la longitud a la que se hace referencia.

[0063] “Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de ácido nucleico” con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido del gen LY6 identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el
10 porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia del ácido nucleico del gen LY6 de interés, respectivamente, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico se puede conseguir de diversas formas que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, el uso del software
15 informático a disposición pública tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente memoria descriptiva, sin embargo, el % de valor de identidad de la secuencia de ácido nucleico se genera usando el programa informático de generación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo del programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 ha sido diseñado por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la
20 Tabla 1 siguiente se ha presentado junto a la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en la que se ha registrado con el U.S. Copyright Registration N°. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de
25 secuencias se configuran mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

[0064] En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de una secuencia C de ácido nucleico dada para, o frente a una
30 secuencia D de ácido nucleico dada (que se puede nombrar como una secuencia C de ácido nucleico dada que tiene o comprende algún % de identidad de la secuencia de ácido nucleico para, con, o frente a una secuencia D de ácido nucleico dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

35 en el que W es el número de nucleótidos puntuados como correspondencias idénticas mediante el programa ALIGN-2 de alineación de secuencias en el que la alineación del programa de C y D, y e el que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia C de ácido nucleico no es igual a la longitud de la secuencia D de ácido nucleico, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de C y D no será igual al % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de D y C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de la
40 secuencia de ácido nucleico, las Tablas 4 y 5, demuestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada “ADN de Comparación” con la secuencia de ácido nucleico designada “REF-DNA”, en la que “REF-DNA” representa una secuencia hipotética de ácido nucleico que codifica el gen LY6 de interés, el “ADN de Comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que la molécula de ácido nucleico “REF-DNA” de interés se está comparando, y “N”, “L” y “V”
45 representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos. A no ser que se establezca de manera específica de otra manera, todos los valores del porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico usados en la presente memoria descriptiva se obtuvieron tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

50 **[0065]** En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes del gen LY6 son moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de LY6, respectivamente, y que son capaces de hibridarse, preferiblemente con hibridación y condiciones de lavado rigurosas, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de LY6 de longitud completa, respectivamente, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polipéptidos pueden ser aquellas que están codificadas por dichas variantes de polinucleótidos.

55 **[0066]** “Aislado”, cuando se usa para describir los diversos polipéptidos LY6 dados a conocer en la presente memoria descriptiva, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir normalmente con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas,
60 hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, dichos polipéptidos se purificarán (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de recipiente giratorio, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Dichos polipéptidos aislados incluyen los polipéptidos correspondientes *in situ* en el interior de células
65 recombinantes, debido a que al menos un componente del polipéptido de LY6 de su entorno natural no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, dichos polipéptidos aislados se prepararán mediante al menos una etapa de

purificación.

[0067] Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de LY6 “aislado” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas anteriormente mencionadas es diferente en forma o configuración de las que se encuentran en la naturaleza. Cualquiera de dichas moléculas de ácido nucleico se distinguen por tanto de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido específico como se encuentran en las células naturales.

[0068] El término “secuencias control” se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operable en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se conocen células eucariotas que utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

[0069] El ácido nucleico está “unido de manera operable” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretora se une de manera operable con el ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une de manera operable a una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. Generalmente, “unido de manera operable” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de la líder secretora, contiguas en la fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

[0070] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva “expresión” como se aplica a expresión génica, se refiere a la transcripción de un gen que codifica una proteína para producir un ARNm así como la traducción del ARNm para producir la proteína codificada por el gen. De esta manera, la expresión creciente o decreciente se refiere a la transcripción creciente o decreciente de un gen y/o a la traducción creciente o decreciente del ARNm resultante de la transcripción.

[0071] Una persona normalmente experta en la técnica determina con facilidad el “rigor” de las reacciones de hibridación, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado de volverse a hibridar cuando están presentes las cadenas complementarias en un entorno por debajo de la temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, resulta que temperaturas relativas más altas tenderían a volver las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas las disminuirían. Para detalles adicionales y una explicación del rigor de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0072] “Condiciones rigurosas” o “condiciones de elevado rigor” tal como se define en la presente memoria descriptiva, se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y elevada temperatura de lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1 % en 50EC, (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/ Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM en 42EC; o (3) hibridación durante la noche en una disolución que emplea formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % en 42EC, con un lavado de 10 minutos en 42EC en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) seguido por un lavado con rigor elevado de 10 minutos consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA en 55EC.

[0073] Se pueden identificar “condiciones moderadamente rigurosas” tal como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas tales como las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37EC en una disolución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC en aproximadamente 37-50EC. La persona normalmente experta en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., a medida que sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[0074] El término “epítope etiquetado”, cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de LY6, o un agente de unión a un polipéptido de LY6 fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítopo frente al cual se puede formar un anticuerpo, que sea todavía lo suficientemente corto de tal manera que no interfiera con la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido etiqueta es también lo suficientemente único de tal manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de manera cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

[0075] “Activo” o “actividad”, para los objetivos de la presente memoria descriptiva se refiere a la(s) forma(s) de polipéptidos que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo que se produce naturalmente, en el que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (tanto inhibidora como estimuladora) producida por un polipéptido nativo que se produce naturalmente diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítopo antigénico poseída por un polipéptido nativo que se produce naturalmente, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítope antigénico poseída por un polipéptido nativo que se produce naturalmente. Un polipéptido activo, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, es un antígeno que se expresa diferencialmente tanto desde una perspectiva cualitativa como cuantitativa, en un tejido IBD, con respecto a su expresión en un tejido similar que no está afectado con IBD.

[0076] El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido natural dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o secuencias de aminoácidos variantes de polipéptidos, péptidos, oligonucleótidos de sentido contrario, pequeñas moléculas orgánicas, naturales, etc. Los procedimientos para identificar antagonistas puede comprender poner en contacto dicho polipéptido, incluyendo una célula que exprese éste, con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con dicho polipéptido.

[0077] “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refiere a un tratamiento terapéutico y profiláctico o a las medidas preventivas, en el que el objeto es evitar o retrasar (disminuyendo) la progresión de una enfermedad. El tratamiento puede referirse también a la modificación de la progresión de una IBD.

[0078] “Diagnosticar” se refiere al proceso de identificar o determinar las características distintivas de una enfermedad que incluye, sin limitación, IBD, UC y/o Enfermedad de Crohn. El proceso de diagnosticar se expresa también algunas veces como tipificación o clasificación de la enfermedad basándose en la gravedad de la progresión de la enfermedad así como en la localización (tal como, por ejemplo, la localización en el interior o a lo largo del tracto gastrointestinal en el que se encuentra la inflamación y/o la expresión génica alterada).

[0079] Los sujetos que necesitan diagnóstico incluyen aquellos que experimentan ya una expresión aberrante de LY6 así como aquellos propensos a tener o aquellos en los que se va a evitar la expresión aberrante de LY6. Se da a conocer en el presente documento la detección de la respuesta a un fármaco terapéutico en un mamífero tratado con un agente terapéutico para el tratamiento de la IBD, en el que el procedimiento comprende determinar la expresión de LY6 en el tejido gastrointestinal de un mamífero de prueba con respecto a un control y determinar que los niveles de expresión de LY6 están comprendidos y no son significativamente diferentes de los niveles de expresión del control normal. Se determina una respuesta terapéutica cuando los niveles de expresión de LY6 del mamífero tratado con un agente terapéutico son diferentes (la expresión es más similar al control normal, es decir, los niveles de expresión de LY6 son inferiores que los niveles de expresión de LY6 que tenía el mamífero antes del tratamiento).

[0080] Los anteriores parámetros para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para la terapia de la IBD, se puede medir la eficacia, por ejemplo, evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando el índice de respuesta (RR) Se pueden realizar biopsias para evaluar la expresión génica y observar la histopatología del tejido gastrointestinal procedente del paciente. La invención descrita en el presente documento relacionada con el procedimiento de pronóstico y/o diagnóstico implica la determinación y la evaluación de la regulación en exceso de la expresión del gen LY6.

[0081] “Mamífero” o “sujeto mamífero”, para los objetivos del tratamiento de, aliviar los síntomas de o el diagnóstico de una IBD se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, los animales domésticos y de granja, y del zoo, para deportes o animales de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, hurones, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

[0082] Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración

simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

[0083] “Vehículos” tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se está exponiendo a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa a pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN₇, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS₇.

[0084] Por “fase sólida” o “soporte sólido” se entiende una matriz no acuosa a la cual se puede adherir o unir un polipéptido, ácido nucleico, anticuerpo o agente de unión de LY6. Los ejemplos de fases sólidas abarcados en la presente memoria descriptiva incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (*por ejemplo*, vidrio poroso controlado), polisacáridos (*por ejemplo*, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (*por ejemplo*, una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 4.275.149.

[0085] Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación en bicapa similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

[0086] Una “molécula pequeña” o “pequeña molécula orgánica” se define en la presente memoria descriptiva por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0087] Una “cantidad eficaz” de un agente antagonista es una cantidad suficiente para producir un efecto fisiológico, tal como sin limitación para inhibir, parcial o completamente, la función del gen o de su proteína codificada. Una “cantidad eficaz” se puede determinar de manera empírica y de una manera rutinaria, en relación con este objetivo.

[0088] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a un antagonista u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de la IBD, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco restaurará la expresión aberrante de LY6 a niveles fisiológicos normales; reducirá la inflamación gastrointestinal, reducirá el número de lesiones gastrointestinales; y/o aliviará en alguna extensión uno o más de los síntomas asociados con la IBD, UC y/o CD. Véase la definición en la presente memoria descriptiva de “tratar”.

[0089] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un antagonista es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente un tumor, *por ejemplo*, una célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. A efectos de inhibir el crecimiento celular neoplásico, se puede determinar dicha cantidad empíricamente y de una manera rutinaria.

[0090] Una “cantidad citotóxica” de un antagonista es una cantidad capaz de producir la destrucción de una célula, especialmente una célula proliferativa, *por ejemplo*, una célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. A efectos de inhibir el crecimiento de las células neoplásicas, se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0091] El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre de manera específica, *por ejemplo*, anticuerpos monoclonales dirigidos contra LY6 (incluyendo anticuerpos antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos dirigidos contra LY6 con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios dirigidos contra LY6, anticuerpos multispecíficos (*por ejemplo*, biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno (véase a continuación) de todos los anticuerpos anteriormente enumerados siempre que presenten la actividad biológica o inmunológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa indistintamente con el de anticuerpo en la presente memoria descriptiva.

[0092] Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso del anticuerpo tal como se ha determinado mediante el procedimiento de Lowry, y lo más preferible más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de recipiente giratorio, o (3) hasta la homogeneidad mediante

SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes debido a que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, se preparará el anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

5

[0093] La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una proteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H) (un anticuerpo IgM consiste en 5 unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene por tanto 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de los diferentes tipos de anticuerpos, véase, *por ejemplo*, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

[0094] Se puede asignar la cadena L de cualquier especie de vertebrado a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), se pueden asignar inmunoglobulinas a diferentes tipos o isotipos. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Los tipos γ y α se dividen adicionalmente en subtipos sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H, *por ejemplo*, los seres humanos expresan los siguientes subtipos. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

[0095] El término "variable" se refiere al hecho de que algunos segmentos de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión del antígeno y define la especificidad de un anticuerpo concreto por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de aproximadamente un tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En vez de esto, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración en lámina β , que adoptan en gran parte una configuración en lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables procedentes de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0096] El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (*por ejemplo*, en torno a aproximadamente los restos 24-34 de Kabat (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L, y en torno a aproximadamente los restos 31-35B de Kabat (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo*, en torno a aproximadamente los restos 26-32 de Chothia (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la V_L, y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en la V_H (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

[0097] El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homólogos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al(a los) mismo(s) epítipo(s), excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. Dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon

entre una pluralidad de clones, tales como un combinado de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc, y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión diana alterada es también un anticuerpo monoclonal. En contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante o un antígeno. Adicionalmente a su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en que están normalmente sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye como producción que necesita del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular: Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden realizar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (véase., Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567), tecnologías de expresión en fagos (véanse, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee y col. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes de todos los loci o genes de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immuno*, 7: 33 (1993); Patentes de los Estados Unidos N.ºs 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; Documento WO 1997/17852; Patentes de los Estados Unidos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

[0098] Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a un tipo o subtipo particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así como a los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado como se usa en la presente memoria descriptiva es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

[0099] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, restos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo tal como la afinidad de unión. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de la inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en las FR es normalmente de no más de 6 en la cadena H, y de no más de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones y col., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

[0100] "Fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos, anticuerpos lineales (véase Patente de los Estados Unidos N.º 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

[0101] La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar

fácilmente. El Fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da como resultado un único fragmento grande F(ab')₂ que corresponde de manera grosera a dos fragmentos Fab unidos por enlace disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y son todavía capaces de la reticulación del antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab porque tienen unos pocos restos adicionales en el extremo carboxilo del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas que proceden de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria descriptiva de Fab' en que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes soporta un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpo.

[0102] El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en algunos tipos de células.

[0103] El fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y un sitio de unión a antígeno completos. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegado de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y la cadena L) que contribuyen a los restos de aminoácidos de la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente 3 CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno aunque con una afinidad inferior que el sitio de unión completo.

[0104] "Fv monocatenario", abreviado también como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv, véanse Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *más abajo*.

[0105] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva "polipéptidos de unión a LY6" es un oligopéptido que se une, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido, ligando o componente de señalización de LY6, respectivamente, o a una porción de unión de LY6 o uno de sus fragmentos. Dichos oligopéptidos pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificarse usando tecnología recombinante. Dichos oligopéptidos tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más. Dichos oligopéptidos se pueden identificar sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. A este respecto, es de señalar que las técnicas para el cribado de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véanse, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicaciones PCT N^{os} WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen y col., en *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378 (1990); Lowman, H.B. y col. Biochemistry, 30: 10832 (1991); Clackson, T. y col. Nature, 352: 624 (1991); Marks, J. D. y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Kang, A.S. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363 (1991), y Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2: 668 (1991).

[0106] Un antagonista de LY6 (por ejemplo, anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula pequeña) "que se une" a un antígeno diana de interés, por ejemplo, LY6 es uno que se une a la diana con suficiente afinidad con el fin de hacer un diagnóstico, pronóstico y/o un agente terapéutico útil en el direccionamiento de una célula o la expresión tisular del antígeno, y no reacciona en cruzado significativamente con otras proteínas. La extensión de la unión a un polipéptido marcador no deseado será inferior de aproximadamente el 10 % de la unión a la diana deseada particular, determinable mediante técnicas convencionales tales como el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o la radioinmunoprecipitación (RIA).

[0107] Además, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico de" un polipéptido de LY6 particular o un epítipo de un polipéptido de LY6 diana particular significa que esta unión se puede medir de una manera diferente a una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula del control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica mediante competición con una molécula control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada En

este caso, la unión específica está indicada si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente por exceso de la diana no marcada. En una realización, dichos términos se refieren a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido. Alternativamente, dichos términos se pueden describir mediante una molécula que tiene una kd para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, o más.

[0108] Una célula o tejido gastrointestinal que “expresa en exceso” LY6 si se muestra que la célula o tejido tiene un aumento de ácido nucleico que codifica LY6 en las células o si esta célula o tejido produce y secreta en exceso la proteína LY6, en comparación con una célula o tejido gastrointestinal normal del mismo tipo de tejido. Dicha expresión en exceso puede ser el resultado de la amplificación génica o de una transcripción o traducción aumentada. Se conocen diversos ensayos diagnósticos o pronósticos que miden los niveles de expresión alterados dando como resultado niveles crecientes o decrecientes en la superficie celular o niveles crecientes o decrecientes de la proteína secretada e incluyen, sin limitación, un ensayo de inmunohistoquímica usando anticuerpos dirigidos contra LY6, análisis FACS, etc. Alternativamente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico o el ARNm que codifica LY6 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación in situ fluorescente usando una sonda basada en ácido nucleico que corresponde a un ácido nucleico que codifica LY6 o uno de sus complementos; (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Alternativamente, la expresión en exceso del polipéptido de LY6 es determinable midiendo el antígeno vertido en un fluido biológico tal como suero, usando, *por ejemplo*, ensayos basados en anticuerpos (véanse también por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.933.294 otorgada el 12 de junio de 1990; documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991; Patente de los Estados Unidos 5.401.638 otorgado el 28 de marzo de 1995; y Sias y col., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Además de los anteriores ensayos, están disponibles para el profesional experto algunos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células en el interior del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, *por ejemplo*, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, *por ejemplo*, mediante barrido externo de la radioactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al agente terapéutico.

[0109] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que se combinan con la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una función de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente de la de la del reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina la parte de la adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0110] La palabra “marca” cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de tal manera que genera un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica marcada. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

[0111] El término “agente citotóxico” tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como pequeñas moléculas de toxinas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, plantas o animales, incluyendo fragmentos y/o sus variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos dados a conocer a continuación. Se describen a continuación otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida produce la destrucción de las células tumorosas.

[0112] Un “agente quimioterapéutico” o “agente terapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de un trastorno o enfermedad. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos o terapéuticos para el tratamiento de la IBD incluyen sin limitación fármacos antiinflamatorios de sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA); el Metroidazol y la ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para el tratamiento de la enfermedad perianal; en los casos más graves, los corticoesteroides son eficaces en el tratamiento de las exacerbaciones y pueden incluso mantener la remisión; azatioprina, 6-mercaptopurina, y metotrexato han mostrado también éxitos en pacientes que requieren la administración crónica de corticoesteroides; Los fármacos antidiarreicos pueden proporcionar también alivio sintomático en algunos pacientes; la terapia nutricional o la dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir la mejora sintomática de la enfermedad aguda; los antibióticos se usan en el tratamiento secundario del crecimiento bacteriano en exceso en el intestino delgado y en el tratamiento de las complicaciones piógenas. Los agentes quimioterapéuticos de la IBD incluyen

además agentes biológicos y otros agentes como los que siguen: anticuerpos dirigidos contra beta7 (véase, por ejemplo, documento WO2006026759), anticuerpos dirigidos contra alfa4 (tales como ANTEGEN®) anticuerpo dirigido contra TNF (REMICADE®) o compuestos sin proteínas que incluyen, sin limitación, compuestos 5-ASA, ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, y otros compuestos tales como Purinetol y esteroides tales como prednisona. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer incluyen hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina; agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN7; alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altetramina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelaimina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL7); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN7), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR7), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; caliestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicamicina, especialmente calicamicina gamma 1I y calicamicina omega 1I (véase por ejemplo., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como neocarzinostatina cromóforo y cromoproteínas relacionadas cromóforos de antibióticos de enediina), aclacinomisininas, actinomicinas, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, ADRIAMYCIN7 doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C. ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina. 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicadona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguaazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo PSK7 de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicadona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE7, FILDESIN7); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL7 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM exento de cromóforo, formulación de nanopartículas de albúmina genomuladas de (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE7 (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR7); 6-tioguanina; mercaptapurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN7); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN7); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE7); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilmitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA7); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0113] El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otras células como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas están las hormonas del crecimiento tales como la hormona humana del crecimiento, N-metionil hormona humana del crecimiento, y la hormona bovina del crecimiento; la hormona paratiroidea; la tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina, hormonas de glicoproteínas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH), y la hormona luteneizante (LH); el factor hepático del crecimiento; factor de crecimiento de los fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor I y II de crecimiento tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferones α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas

(IL) tales como IL-1, IL- 1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen el ligando LIF y kit (KL). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o procedentes de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias naturales.

5

[0114] El término “prospecto” se usa para referirse a las instrucciones personalizadas incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, utilización, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias que se refieren al uso de dichos productos terapéuticos

10

[0115] “Epitelios”, “epitelial” y “epitelio” se refiere a la cubierta celular de las superficies corporales internas y externas (cutánea, mucosa y serosa), que incluye las glándulas y otras estructuras derivadas de las anteriores, por ejemplo, córnea, esofágica, epidérmica, y las células epiteliales foliculares del cabello. Otros tejidos epiteliales a modo de ejemplo incluyen: epitelio olfatorio – el epitelio pseudoestratificado que tapiza la región olfatoria de la cavidad nasal, y que contiene los receptores del sentido del olfato; epitelio glandular – el epitelio compuesto por células secretoras del epitelio escamoso; epitelio escamoso – el epitelio que comprende una o más capas de células, la más superficial de las cuales está compuesta de células planas similares a escamas o similares a placas. El epitelio puede también referirse al epitelio de transición, similar al que se encuentra característicamente tapizando órganos huecos que están sometidos a un gran cambio mecánico debido a la contracción y a la distensión, *por ejemplo*, el tejido que representa una transición entre el epitelio escamoso estratificado y el epitelio columnar.

15

[0116] El “estado de crecimiento” de una célula se refiere a la velocidad de proliferación de la célula y/o al estado de diferenciación de la célula. Un “estado de crecimiento alterado” es un estado de crecimiento caracterizado por una velocidad anormal de proliferación, *por ejemplo*, una célula que presenta una velocidad creciente o decreciente de proliferación con respecto a una célula normal.

25

[0117] El término “LY6” o “polipéptido de LY6” se usa en la presente memoria descriptiva para referirse genéricamente a cualquiera de los homólogos de mamíferos de la familia del gen LY6 de mamíferos. El término “LY6” se puede usar para describir la proteína o el ácido nucleico.

30

[0118] El término “expresión en exceso” tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los niveles celulares de expresión génica de un tejido que son superiores a los niveles de expresión normales de este tejido. El término “expresión en defecto” tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los niveles celulares de expresión génica de un tejido que son inferiores a los niveles de expresión normales de este tejido. En cualquier caso, la expresión superior o inferior es significativamente diferente de la expresión normal en las condiciones controladas del estudio.

35

[0119] Un “control” incluye una muestra obtenida para uso en la determinación de los niveles iniciales o la expresión normal o la actividad en un mamífero que no experimenta la IBD. De acuerdo con esto, se puede obtener una muestra del control mediante numerosos medios, que incluyen de tejidos o células no afectados por la inflamación y/o la IBD, UC o CD (tal como se determina mediante técnicas normalizadas), de células o tejidos sin IBD, por ejemplo, de las células de un sujeto que no experimenta IBD; de sujetos que no tienen una IBD, enfermedad de Crohn, o trastorno de colitis ulcerosa; de sujetos no sospechosos de estar en riesgo de una IBD, CD o UC; o de las células o líneas de células derivadas de dichos sujetos. Un control incluye también un patrón previamente establecido. Para los ensayos, tales como los ensayos de ARNm, que incluyen los ensayos de micromatriz, un control puede ser un control universal. Dicho control universal se refiere a la información de la expresión del ARN de un gen LY6 concreto obtenido del ARN aislado de una mezcla de tejidos sanos o de una mezcla de líneas celulares derivadas de diversos tejidos tales como, sin limitación, los ARN universales de referencia dados a conocer en la presente memoria descriptiva. De acuerdo con esto, cualquier prueba o ensayo llevado a cabo de acuerdo con la invención se puede comparar con el patrón establecido y puede no ser necesario obtener una muestra del control para comparación cada vez.

40

45

50

Tabla 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */  { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */  {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */  { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */  { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */  {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */  { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */  {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */  {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */  {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */  {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */  { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */  {_M, _M, _M},
/* P */  { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */  { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */  {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */  { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */  { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */  {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */  {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */  { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

Tabla 1 (cont. 1)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3      /* value of matching bases */
#define DMIS        0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8      /* penalty for a gap */
#define DINS1       1      /* penalty per base */
#define PINS0       8      /* penalty for a gap */
#define PINS1       4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
}; /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;     /* score at last jmp */
    long           offset;    /* offset of prev block */
    short          ijmp;     /* current jmp index */
    struct jmp     jmp;      /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;       /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];   /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];   /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;    /* output file name */
char              *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char              *prog;     /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];  /* seqs: getseqs() */
int               dmax;      /* best diag: nw() */
int               dmax0;     /* final diag */
int               dna;       /* set if dna: main() */
int               endgaps;   /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int               len0, len1; /* seq lens */
int               ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int               smax;      /* max score: nw() */
int               *xbm;      /* bitmap for matching */
long              offset;    /* current offset in jmp file */
struct diag       *dx;       /* holds diagonals */
struct path       pp[2];     /* holds path for seqs */

char              *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char              *getseq(), *g_calloc();

```

Tabla 1 (cont. 2)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int      ac;
char     *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw( );               /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps( );        /* get the actual jmps */
    print( );           /* print stats, alignment */

    cleanup(0);         /* unlink any tmp files */
}

```

main

Tabla 1 (cont. 3)

```

/* do the alignment, return best score: main( )
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw( )
{
    char          *px, *py;           /* seqs and ptrs */
    int           *ndely, *dely;      /* keep track of dely */
    int           ndelx, delx;        /* keep track of delx */
    int           *tmp;               /* for swapping row0, row1 */
    int           mis;                /* score for each type */
    int           ins0, ins1;         /* insertion penalties */
    register      id;                 /* diagonal index */
    register      ij;                 /* jmp index */
    register      *col0, *coll;       /* score for curr, last row */
    register      xx, yy;             /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    coll = (int *)g_calloc("to get coll", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                coll[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                coll[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            coll[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

Tabla 1 (cont. 4)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } else {
    if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } else
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } else
      ndelx++;
  }

  /* pick the maximum score; we're favoring
   * mis over any del and delx over dely
   */

```

Tabla 1 (cont. 5)

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

...BW

Tabla 1 (cont. 6)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align( );
}

```

Tabla 1 (cont. 7)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;
    int    firstgap, lastgap;
    /* "core" (minus endgaps) */
    /* leading trailing overlap */

{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double  pct;
    register    n0, n1;
    register char    *p0, *p1;

    /* get total matches, score
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
    * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
    * else, knock off overhangs and take shorter core
    */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%=d match%$ in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

Tabla 1 (cont. 8)

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;       /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];      /* jmp index for a path */
static      nc[2];      /* number at start of current line */
static      ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars( ) */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align( )
{
    int      nn;        /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_aligo

Tabla 1 (cont. 9)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock( );
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align( )
 */
static
dumpblock( )
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

Tabla 1 (cont. 10)

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars( );
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock( )
 */
static
nums(ix)
int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
char    nline[P_LINE];
register    i, j;
register char    *pn, *px, *py;

for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
    *pn = ' ';
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == ':')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
 */
static
putline(ix)
int    ix;
putline

```

...dumpblock

nums

putline

Tabla 1 (cont. 11)

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock( )
 */
static
stars( )
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

Tabla 1 (cont. 12)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align( )
 */
static
stripname(pn)                                stripname
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

Tabla 1 (cont. 13)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw( )
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup( ); /* cleanup tmp file */
long lseek( );

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i) /* cleanup */
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len) /* getseq */
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
    {
        char line[1024], *pseq;
        register char *px, *py;
        int natgc, tlen;
        FILE *fp;

        if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
            exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: malloc( ) failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
            exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
    }
}
Page 1 of nwsubr.c

```

Tabla 1 (cont. 14)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc ();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc () failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main( )
 */
readjmps ( )
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

...getseq

g_alloc

readjmps

Tabla 1 (cont. 15)

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

```

Tabla 1 (cont. 16)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw( )
 */
writejmps(ix)                                     writejmps
{
    int    ix;
    char   *mktemp( );

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Tabla 2

Referencia	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)
% de identidad de la secuencia de aminoácidos =		
(el número de restos de aminoácidos con correspondencia idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas tal como se determinó mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de referencia)		
= 5 dividido por 15 = 33,3 %		

5

Tabla 3

Referencia	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)
% de identidad de la secuencia de aminoácidos =		
(el número de restos de aminoácidos con correspondencia idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas tal como se determinó mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido de referencia)		
= 5 dividido por 10 = 50 %		

Tabla 4

ADN de referencia	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)
% de identidad de la secuencia de ácido nucleico =		
(el número de nucleótidos con correspondencia idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico tal como se determinó mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN de referencia)		
= 6 dividido por 14 = 42,9 %		

Tabla 5

ADN de referencia	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)
% de identidad de la secuencia de ácido nucleico= (el número de nucleótidos con correspondencia idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico tal como se determinó mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN de referencia) = 4 dividido por 12 = 33,3 %		

Procedimientos diagnósticos

5 [0120] Se contempla adicionalmente que el uso de agentes terapéuticos para la IBD se puede dirigir específicamente a trastornos en los que el tejido y/o las células afectadas presentan una expresión creciente de LY6 con respecto al control. De acuerdo con esto, se contempla que la detección de la expresión creciente de LY6 se puede usar para detectar la IBD, tal como la CD o la UC, en el tejido gastrointestinal de un mamífero y/o para identificar tejidos y trastornos que se beneficiaran de manera particular del tratamiento con un agente terapéutico de la IBD, incluyendo un agente quimioterapéutico, útil en la mejora de la IBD, la UC y/o la CD en un paciente humano.

15 [0121] En las realizaciones preferidas, se detectan los niveles de expresión de LY6, tanto mediante detección directa del gen transcrito como mediante la detección de los niveles o la actividad de las proteínas. Se pueden detectar los transcritos usando cualquiera de una amplia gama de técnicas que dependen principalmente de la hibridación o de las sondas de los transcritos de ARNm de LY6, para sintetizar los ADNc de las anteriores, o para el ADN en el que está presente la amplificación del gen LY6. Las técnicas bien conocidas incluyen la transferencia Northern, la PCR mediante transcriptasa inversa y el análisis de micromatriz de los niveles de los transcritos. Los procedimientos para detectar los niveles de la proteína LY6 incluyen la transferencia Western, la inmunoprecipitación, la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D SDS-PAGE – preferiblemente en comparación frente a un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas LY6), y la espectroscopía de masas. Se puede acoplar la espectroscopía de masas con una serie de etapas de purificación para permitir la identificación de alto rendimiento de muchos niveles de proteínas diferentes en una muestra particular. La espectrometría de masas y la 2D SDS-PAGE se pueden usar también para identificar las modificaciones después de la transcripción de las proteínas que incluyen los episodios proteolíticos, la ubiquitinación, fosforilación, modificación de lípidos, etc. Se puede evaluar también la actividad de LY6 analizando la unión del ADN al sustrato o en la activación de la transcripción *in vitro* de los promotores diana. El ensayo de modificación en gel, los ensayos de la huella de ADN, y los ensayos de reticulación del ADN-proteína son todos procedimientos que se pueden usar para evaluar la presencia de una proteína capaz de unirse a los sitios de unión Gli en el ADN. *J Mol. Med* 77(6):459-68 (1999); *Cell* 100(4): 423-34 (2000); *Development* 127(19): 4923-4301 (2000).

30 [0122] En algunas realizaciones, se midieron los niveles de LY6 transcrito, y los tejidos enfermos o con trastornos que mostraron niveles de LY6 significativamente elevados con respecto al control, se trataron con un compuesto terapéutico de la IBD. De acuerdo con esto, los niveles de expresión de LY6 son una medida diagnóstica poderosa para determinar si un paciente está experimentando la IBD y si este paciente debe recibir un agente terapéutico de la IBD.

Composiciones de anticuerpos para uso en los procedimientos de la invención

A. Anticuerpos dirigidos contra LY6

40 [0123] Se da a conocer en la presente memoria descriptiva el uso de anticuerpos dirigidos contra LY6, que pueden encontrar uso en la presente memoria descriptiva como agentes terapéuticos, diagnósticos y/o pronósticos en la determinación de la existencia, gravedad de y/o pronóstico del curso de la enfermedad de una enfermedad inflamatoria del intestino tal como la UC. Los anticuerpos a modo de ejemplo que se pueden usar para dichos objetivos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados. El término "anticuerpos" incluye también algunas veces los fragmentos de unión a antígeno. Están comercialmente disponibles anticuerpos dirigidos contra LY6, tales como, por ejemplo, de R&D Systems, Minneapolis, MN. Se pueden obtener comercialmente anticuerpos que se unan específicamente a LY6 como antígenos o prepararse mediante procedimientos normalizados conocidos en la técnica de los anticuerpos y de la química de proteínas para uso en el procedimiento de la invención. Se dan a conocer anticuerpos para LYPD, por ejemplo, en el documento USUS7.144.990.

1. Anticuerpos policlonales

55 [0124] Los anticuerpos policlonales se estimulan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y de un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar en hemocianina de lapa californiana

(KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, *por ejemplo*, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina) glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son diferentes grupos alquilo.

5

[0125] Se inmunizaron animales frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales recibieron un estímulo de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o del

10

conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangraron y se evaluó el suero para el título del anticuerpo. Los animales recibieron un estímulo de refuerzo hasta que los títulos llegaron a la meseta. Se pueden formar también conjugados en cultivos celulares recombinantes como fusiones de proteínas. También, agentes de agregación tales como el alum se usan de manera adecuada para aumentar la respuesta inmune.

15

2. Anticuerpos monoclonales

[0126] Se pueden crear anticuerpos monoclonales usando el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden crear mediante procedimientos de ADN recombinante

20

[0127] En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente para estimular los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los

25

linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Tras la inmunización, se aislaron los linfocitos y a continuación se fusionaron con una línea de células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

30

[0128] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se sembraron y se hicieron crecer en un medio de cultivo adecuado cuyo medio contenía preferiblemente una o más sustancias que inhibían el crecimiento o la supervivencia de las células parentales de mieloma, sin fusionar (denominadas también como compañeras de fusión). Por ejemplo, si las células parentales de mieloma carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo de los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina,

35

aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

[0129] Las células de mieloma compañeras de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan de manera estable altos niveles de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que las selecciona frente a las células parentales sin fusionar.

40

Las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma de murino, tales como las derivadas de los tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón, disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y SP-2 y derivadas, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU. Se han descrito también líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

45

[0130] Se evaluó el medio de cultivo en el cual se hicieron crecer las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determinó mediante inmunoprecipitación o mediante el ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)

50

[0131] Se puede determinar, por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal mediante el análisis

55

Scatchard descrito en Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

[0132] Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones limitando los procedimientos de dilución y haciéndolos crecer mediante procedimientos normalizados (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este objetivo incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640, se pueden hacer crecer las células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascites en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en ratones.

60

[0133] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, fluido de ascites, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, *por ejemplo*, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sefarosa) o

65

cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0134] El ADN que codificaba los anticuerpos monoclonales se aisló y se secuenció fácilmente usando procedimientos convencionales (usando, por ejemplo, sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfentan a continuación en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes.

10 Los artículos para revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

[0135] En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de bibliotecas anticuerpos contra fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) que describen el aislamiento de Anticuerpos de murino y sr humano, respectivamente, Usando bibliotecas de fagos. Posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia de construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). De esta manera, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0136] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión sustituyendo, por ejemplo, las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera humanas (C_H y C_L) por las secuencias homólogas de murino (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia de codificación de la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias del polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprenda un sitio de combinación a antígeno para un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0137] Los anticuerpos dirigidos contra LY6 útiles en la práctica de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en las secuencias del anticuerpo receptor ni en la CDR o el marco importados. En general, el anticuerpo humanizados comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

[0138] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de la CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos resto de la FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0139] La elección de dominios variables humanos, ligero y pesado, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano dirigido contra ratón) cuando se pretende que el anticuerpo sea para uso terapéutico humano. De acuerdo con el procedimiento del “mejor ajuste” así denominado, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de las secuencias conocidas del dominio variable humano. La secuencia del dominio V humano que se encuentra más cercana a la del roedor se identifica y la región marco humana (FR) en el interior de ésta se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco para algunos anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta y col., J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

[0140] Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de una elevada afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir esta meta, de acuerdo con un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse con su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse entre las secuencias receptora e importada de tal manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como el aumento de afinidad por el(los) antígeno(s) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y lo más sustancialmente implicados en influenciar la unión del antígeno.

[0141] Se contemplan diversas formas de anticuerpos humanizados del anticuerpo dirigido contra LY6. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxico(s) con el fin de generar un inmunocombinado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0142] Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes de una línea quimérica y germinal da como resultado la completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo del antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno. 7: 33 (1993); Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y documento WO 97/17852.

[0143] Alternativamente, se puede usar la tecnología de expresión de fagos (McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos del dominio variable de la inmunoglobulina (V) procedentes de donantes inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en cualquiera de un gen de la proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M 13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan también como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. De esta manera, el fago imita alguna de las propiedades del linfocito B. Se puede llevar a cabo la expresión del fago en una variedad de formatos, revisada en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Se pueden usar diversas fuentes de segmentos del gen V para la expresión del fago. Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivada de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (que incluye autoantígenos) que se pueden aislar siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.565.332 y 5.573.905.

[0144] Tal como se ha discutido anteriormente, se pueden generar también anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse Patentes de los Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpo

[0145] En algunas circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpo, más bien que de

anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un rápido aclaramiento, reteniendo a la vez una similar especificidad de unión al antígeno de la molécula de longitud completa correspondiente, y puede conducir a una mejora del acceso a tumores sólidos.

5 **[0146]** Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, *por ejemplo*, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos en y secretarse de *E. coli*,
 10 permitiendo de esta manera la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos dirigidos contra fagos discutidas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra solución, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los
 15 fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida creciente in vivo que comprenden restos de epítomos de unión a receptores salvajes se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes al profesional experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la Patente de los Estados Unidos N° 5.571.894; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de
 20 combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; de esta manera, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión sFv se pueden construir para dar como resultado la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los términos amino o carboxilo de una sFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, más arriba. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.641.870. Dichos fragmentos de
 25 anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0147] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos
 30 epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unir antígenos separados o unir los dos diferentes epítomos de un polipéptido de LY6 concreto descrito en la presente memoria descriptiva. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar el anterior sitio de unión de LY6 con un sitio de unión para otra proteína. Cuando el anticuerpo biespecífico es útil en el procedimiento de la invención, el segundo brazo de anticuerpo puede unir un polipéptido detectable. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa
 35 o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0148] Se conocen en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera, en las que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., *Nature* 305:
 40 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se lleva a cabo usualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante molesta, y los rendimientos del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/088829, y en Trauneker y col., *EMBO J.*
 45 10: 3655-3659 (1991).

[0149] De acuerdo con una solución diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de la Ig, que
 50 comprende al menos parte de las regiones bisagra C_H2, y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C_H1) conteniendo el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se transfecta simultáneamente en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos
 55 usados en la construcción proporcionan el óptimo rendimiento del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible, insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las relaciones no tienen efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de la cadena deseada.

[0150] En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por la
 60 cadena pesada de una inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de la cadena de inmunoglobulina no deseada, ya que la presencia de una cadena ligera de
 65 inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil forma de separación. Se da a conocer esta solución en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos

biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

[0151] De acuerdo con otra solución descrita en la Patente de los Estados Unidos N° 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas secundarias de aminoácidos de la interfase del primer anticuerpo se sustituyen con cadenas secundarias más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar de la(s) cadena(s) secundaria(s) grande(s) se crean sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas secundarias de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como los homodímeros.

[0152] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados encuentran uso también en el presente procedimiento de la invención para proporcionar múltiples marcadores detectables (tanto diferentes como iguales) en cada anticuerpo para una mejora en la detección del ensayo. Se pueden crear anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica los agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con numerosas técnicas de reticulación.

[0153] Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan y col., *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejación del ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles próximos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de los otros derivados Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0154] Recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab')₂ de un anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra las dianas de tumores de mama humanos.

[0155] Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente desde el cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos en cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento se puede utilizar también para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. De acuerdo con esto, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan para emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando por tanto dos sitios de unión a antígeno. Se ha informado también de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

[0156] Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

6. Anticuerpos multivalentes

[0157] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual los anticuerpos se unen. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de tipo IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende

(o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminoterminales en la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente memoria descriptiva comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (y preferiblemente dos cadenas de polipéptidos), en el que la(s) cadena(s) de polipéptido(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido(s) pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido(s) pueden comprender una cadena de la región VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-Fc; o una cadena de la región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva comprende además preferiblemente al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede, por ejemplo, comprender entre aproximadamente dos y aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

7. Genomanipulación de la función efectora

[0158] Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo por tanto la formación del enlace disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento aumentada y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Se pueden preparar también Anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada Usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede genomanipular un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener por consiguiente una lisis aumentada del complemento y capacidades ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989). Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "epítipo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida de la molécula de IgG en suero *in vivo*.

8. Inmunoconjugados

[0159] Se han divulgado en la presente memoria descriptiva inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo, es decir, un radioconjugado) y/o una marca detectable.

a. Agentes quimioterapéuticos

[0160] Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de la diantina, las proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), el inhibidor de momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina, y los tricotecenos. Están disponibles una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-fifluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metil dietileno triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026.

[0161] Se contemplan también en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065 y los derivados de

estas toxinas que tienen actividad de toxina.

B. Oligopéptidos de unión a LY6

5 **[0162]** Los oligopéptidos de unión a LY6 son oligopéptidos que se unen, preferiblemente de manera específica, con un polipéptido de LY6 tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos de unión a LY6 se pueden sintetizar químicamente usando la metodología conocida de síntesis de oligopéptidos o se pueden preparar y purificarse usando tecnología recombinantes. Los oligopéptidos de unión a LY6 tienen al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más, en el que dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido de LY6 tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos de unión a LY6 se pueden identificar sin experimentación innecesaria usando técnicas bien conocidas. A este respecto, es de señalar que las técnicas para el cribado de bibliotecas de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la materia (véanse, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicaciones PCT N^{os} WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668).

25 **[0163]** A este respecto, la expresión del bacteriófago (fago) es una técnica bien conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar el(los) miembro(s) de aquellas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión del fago es una técnica mediante la cual variantes de polipéptidos se expresan como proteínas de fusión para el revestimiento de la proteína sobre la superficie de partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la expresión del fago se basa en el hecho de que se pueden clasificar de manera rápida y eficaz grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas de manera selectiva (o ADNc clonados de manera aleatoria) para las secuencias que se unen a una molécula diana con elevada afinidad, La expresión de las bibliotecas peptídicas (Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o la proteína (Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30: 10832;
30 Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha usado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos para unos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad usando el receptor diana, y un medio de evaluar los resultados de los enriquecimientos de la unión. Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143.

[0164] Aunque la mayor parte de procedimientos de expresión de fagos han usado fagos filamentosos, se conocen también sistemas de expresión de fagos lambdoides (documento WO 95/34683; documento U.S. 5.627.024),
45 sistemas de expresión de fagos T4 (Ren y col., Gene, 215: 439 (1998); Zhu y col., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang y col., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren y col., Gene, 195(2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov y col., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión de fagos T7 (Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905).

50 **[0165]** Se han desarrollado en la actualidad muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión de fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión de cribar bibliotecas de péptidos para la unión a moléculas diana seleccionadas y a las propiedades funcionales de expresión con el potencial de cribado de estas proteínas para las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos combinatorios de reacción para las reacciones de expresión de fagos (documento WO 98/14277) y se han usado las bibliotecas de expresión de
55 fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (Documentos WO 98/20169; WO 98/20159) y las propiedades de péptidos helicoidales restringidos (documento WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un procedimiento de aislar un ligando de afinidad en el que la biblioteca de expresión de fagos se pone en contacto con una disolución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda disolución en la que el ligando de afinidad no se unirá con la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. El documento WO
60 97/46251 describe un procedimiento de someter a ciclos de selección de fagos por afinidad una biblioteca de expresión de fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación aislar el fago de unión seguido por un procedimiento de selección de fagos por microafinidad usando pocillos de microplacas para aislar fagos de unión de elevada afinidad. Se ha informado también el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como una etiqueta de afinidad (Li y col. (1998) Mol Biotech., 9: 187). El documento WO 97/47314 describe el uso de
65 bibliotecas de sustración de sustratos para distinguir las especificidades enzimáticas usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión de fagos. Un procedimiento para seleccionar enzimas

adecuadas para el uso en detergentes usando la expresión de fagos se describe en el documento WO 97/09446. Se describen procedimientos adicionales de selección de proteínas de unión en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.498.538, 5.432.018, y en el documento WO 98/15833.

5 **[0166]** Los procedimientos para generar bibliotecas de péptidos y cribar estas bibliotecas se dan también a conocer en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, y 5.723.323.

[0167] Se dan a conocer en la presente memoria descriptiva ligandos del polipéptido LYPD5. La Figura 32
10 demuestra esto mostrando células COS sin transfectar (A) y células COS transfectadas con GLG-1 y teñidas con la proteína LYPDS-Fc. El ligando de LYPDS puede ser la glicoproteína 1 (GLG-1) localizada en el complejo de Golgi o el polipéptido de la E-selectina (ESL-1) tal como se muestra en las SEQ ID NOS:18, 20, 22, o 24, codificado por el ácido nucleico que se muestra como las SEQ ID NOS: 17, 19, 21, o 23, respectivamente. El polinucleótido que codifica un polipéptido GLG-1 puede comprender al menos 15, al menos 25, al menos 50, al menos 100,
15 al menos 250, al menos 55, al menos 750, al menos 1000, al menos 1250, al menos 1500, al menos 1750, al menos 2000, al menos 2040, al menos 2090, al menos 2150, al menos 2200, al menos 2300, al menos 2400, al menos 2500, al menos 2600, al menos 2700, al menos 2800, al menos 2900, al menos 3000, al menos 3100, al menos 3200, al menos 3300, al menos 3400, al menos 3500, al menos 3600, al menos 3700, o al menos 3720 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOS 17, 19, 21, o 23, o el polinucleótido que codifica un GLG-1 comprende las SEQ ID
20 NOS 17, 19, 21, o 23. La divulgación de la presente memoria descriptiva es un polinucleótido que se une a un polinucleótido que codifica un GLG-1 (SEQ ID NOS: 17, 19, 21, o 23), o uno de sus fragmentos, y tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de la secuencia con el polipéptido GLG-1 o uno de sus fragmentos. En una realización, el polipéptido GLG-1 comprende al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300,
25 al menos 325, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650, al menos 700, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, al menos 950, al menos 1000, al menos 1050, al menos 110, al menos 1150, o al menos 1200 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NOS: 18, 20, 22, o 24, o el polipéptido GLG-1 comprende las SEQ ID NOS: 18, 20, 22, o 24. GLG-1 o ESL-1 se expresa en neutrófilos, se cree que está implicado en la extravasación de los neutrófilos en los tejidos, y se piensa que juega un papel importante en la inflamación (véase Hidalgo y col. (2007) Immunity, 26(4): 477-489). GLG-1 o ESL-1 tiene 14 dominios GLG1 ricos en cisteína. El dominio extracelular (ECD) es prolongado y como se describe a continuación, se encontraron variantes o fragmentos de GLG1 ECD que tenían la capacidad de unirse a LYPD5.

35 **[0168]** El ligando LYPD5 puede ser una variante o fragmento de una molécula de GLG-1 o ESL-1 descrita en la presente memoria descriptiva. Tal como se muestra en la Figura 33A-B, GLG-1 o ESL-1 pueden verse como los fragmentos 1, 2, 3 y 4 y se describen en el Ejemplo 11, uno cualquiera de los 4 fragmentos es suficiente para la unión de LYPD5. Puede ser

40 **[0169]** El ligando LYPD5 puede ser una variante o fragmento de GLG- o ESL-1 que es un único dominio GLG-1. Tal como se muestra en la Figura 34A-B, GLG-1 se prepara de múltiples dominios GLG-1 y como se describe en el Ejemplo 11, un único dominio GLG-1 es suficiente para la unión de LYPD5.

[0170] El ligando LYPD5 puede ser una variante o fragmento de GLG-1 o ESL-1 que es específica de LYP5. Tal
45 como se muestra en la Figura 35A-B, GLG-1 incluye los dominios 26-114, el dominio 115 y el dominio 150 y como se describe en el Ejemplo 11, el dominio 115 se une a LYPD5 pero los dominios 26-114 no se unen a LYPD5.

C. Variantes de polipéptidos

50 **[0171]** Además de los polipéptidos, los anticuerpos y los polipéptidos de unión de LY6 descritos en el presente documento, se contempla en la presente memoria descriptiva que se puedan preparar variantes de dichas moléculas para el uso con la invención. Dichas variantes se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante la síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos después de la traducción de estas
55 moléculas, tales como el cambio de número o posición de los sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje de la membrana.

[0172] Se pueden realizar variaciones en la secuencia de aminoácidos usando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas que se muestran, por ejemplo, en la
60 Patente de los Estados Unidos N^o 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican la secuencia de aminoácidos que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia natural. Opcionalmente, la variación se realiza mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la secuencia de aminoácidos de interés. La directriz para determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o
65 eliminar sin afectar adversamente la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia de la secuencia de aminoácidos de interés con moléculas homólogas de la proteína conocida y minimizar el número de

cambios de la secuencia de aminoácidos con otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es *decir*, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones y deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. Se puede determinar la variación permitida realizando inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos de manera sistemática en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad presentada por la secuencia natural de longitud completa o madura.

[0173] Se proporcionan en la presente memoria descriptiva fragmentos de diversos polipéptidos. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína natural de longitud completa. Dichos fragmentos que carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada son también útiles con los procedimientos dados a conocer.

[0174] Los anteriores fragmentos de polipéptidos se pueden preparar mediante cualquier número de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Una solución alternativa implica generar dichos fragmentos mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida que escinda las proteínas en los sitios definidos por los restos de aminoácidos particulares, o difiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica el fragmento deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, dichos fragmentos comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con la correspondiente molécula de longitud completa.

[0175] En realizaciones concretas, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezado de las sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, se introducen a continuación más cambios sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a los tipos de aminoácidos, y se criban los productos con el fin de identificar la variante deseada.

30

<u>Tabla 6</u>		
Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

[0176] Se llevan a cabo modificaciones sustanciales en la función de la identidad inmunológica del polipéptido de LY6 seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena secundaria. Los restos que se producen naturalmente se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena secundaria:

35

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln;
 (3) ácidos: Asp, Glu;
 (4) básicos: His, Lys, Arg;
 5 (5) restos que influyen la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
 (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

[0177] Sustituciones no conservativas que implicarán el intercambio de un miembro de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituido se pueden introducir también en los sitios de sustitución conservativos o, más
 10 preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

[0178] Se pueden realizar las variaciones usando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al emplazamiento), barrido de alanina, y mutagénesis mediante la PCR. Se pueden llevar a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento (Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331
 15 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), mutagénesis mediante casete (Wells y col., Gene, 34: 315 (1985)), mutagénesis de selección mediante restricción (Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)) u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir la molécula anti-LY6.

[0179] Se puede emplear también el análisis de barrido de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos
 20 junto a una secuencia contigua. Entre los aminoácidos barridos preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. Entre este grupo, un aminoácido barrido preferido es normalmente la alanina debido a que elimina la cadena secundaria más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)). Se prefiere también normalmente la alanina debido a que es el
 25 aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones soterradas y expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)). Si la sustitución de la alanina no da como resultado cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

[0180] Se puede sustituir también cualquier resto de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada
 30 del polipéptido de LY6, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. De manera inversa, se pueden añadir enlace(s) de cisteína a dicha molécula para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

[0181] Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de regiones
 35 hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando la expresión de fagos. De manera breve, algunos sitios de la región hipervariable están mutados para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las
 40 variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones como fusiones del producto génico III del M13 empaquetado en el interior de cada partícula. Las variantes que expresaron fagos se cribaron a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se ha dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Con el fin de identificar sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de
 45 barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido diana. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos de sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal
 50 como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para desarrollo adicional.

[0182] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos variantes de los polipéptidos LY6 se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen,
 55 pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al emplazamiento), mutagénesis mediante la PCR, y mutagénesis mediante casete de una secuencia natural o en una variante preparada anteriormente.

60 **D. Modificaciones de polipéptidos**

[0183] Los polipéptidos y/o anticuerpos que se han modificado covalentemente pueden ser también adecuados para el uso dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos dirigidos de dichos anticuerpos y polipéptidos con un agente derivatizante orgánico que sea capaz
 65 de reaccionar con cadenas secundarias seleccionada o los restos N o C terminales de dichos anticuerpos y

polipéptidos. Es útil la derivatización con agentes bifuncionales, por ejemplo, para reticular las moléculas anteriores a una matriz soporte insoluble en agua o superficie para uso en la purificación. Los agentes reticulantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo 5 ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0184] Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutamilo y asparagilo con los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina, y de las cadenas secundarias de histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación del amino N terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

[0185] Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos o anticuerpos comprende alterar el modelo natural de glicosilación del anticuerpo o polipéptido. Se pretende que "alterar el modelo natural de glicosilación" para los 15 objetivos de la presente memoria descriptiva signifique eliminar uno o más restos carbohidratos que se encuentran en la secuencia natural (tanto eliminando el sitio de glicosilación subyacente como eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia natural respectiva. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas naturales, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de diversos restos carbohidratos presentes.

[0186] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos está normalmente tanto unida a N como unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena secundaria de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena 25 secundaria de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetil galactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácidos, más comúnmente serina o treonina, aunque se puede usar también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0187] La adición de sitios de glicosilación se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las anteriores secuencias tripeptídicas descritas (para los sitios de glicosilación unidos a N). Se puede realizar también la alteración mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del mencionado anticuerpo o polipéptido original (para los sitios de glicosilación unidos a O). Dicha secuencia de anticuerpo o polipéptido se puede alterar opcionalmente mediante cambios a nivel 35 del ADN, particularmente, mutando el ADN que codifica las secuencias de aminoácidos anteriores en bases preseleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0188] Otro medio de aumentar el número de restos carbohidratos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Se describen dichos procedimientos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 40 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

[0189] La eliminación de restos carbohidratos se puede llevar a cabo química o enzimáticamente o mediante sustituciones mutacionales de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como dianas para la 45 glicosilación. Se conocen en la técnica técnicas de desglicosilación química y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) y en Edge y col., *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). Se puede conseguir la escisión enzimática de restos carbohidratos en polipéptidos mediante una variedad de endo y exoglicosidasas tal como se describe por Thotakura y col., *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

[0190] Otro tipo de modificación covalente comprende la unión con uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera que se muestra en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.640.835; 4.496.689, 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. El polipéptido de LY6 puede estar también atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y 55 microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Se dan a conocer dichas técnicas en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16^a edición, Oslo, A., Ed., (1980).

[0191] Las modificaciones que forman moléculas quiméricas son el resultado de fusiones de un polipéptido con otro, se contemplan polipéptidos heterólogos o secuencias de aminoácidos para uso con los presentes procedimientos.

[0192] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido con un polipéptido 65 etiqueta que proporciona un epítipo al cual se puede unir de manera selectiva un anticuerpo anti etiqueta. El epítipo etiqueta se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo de dicho anticuerpo o polipéptido. Se puede

detectar la presencia de dichas formas de epítomos etiquetados de dichos anticuerpos o polipéptido usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la provisión del epítomo etiqueta permite que dichos anticuerpos o polipéptidos se purifiquen fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítomo etiqueta. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiquetas y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la anterior (Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del Herpes Simple y su anticuerpo (Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp y col., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)); el péptido del epítomo KT3 (Martin y col., Science, 255: 192-194 (1992)); un péptido del epítomo de la α -tubulina (Skinner y col., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)); y la etiqueta del péptido de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)).

15 **[0193]** En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (denominada también como una "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser en la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo o polipéptido anterior en el lugar de al menos una región variable en el interior de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la inmunoglobulina de fusión incluye la bisagra, CH₂ y CH₃, o la bisagra, CH₁, CH₂ y las regiones CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de inmunoglobulinas de fusión, véase también la Patente de los Estados Unidos N° 5.428.130 otorgada el 27 de junio de 1995.

25 **E. Preparación de polipéptidos**

[0194] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de dichos anticuerpos, polipéptido y oligopéptidos. El término "polipéptidos" puede incluir anticuerpos, polipéptidos y oligopéptidos. Se contempla, por supuesto, que procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, se puedan emplear para preparar dichos anticuerpos, polipéptido y oligopéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o sus porciones, se pueden producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida [véase, *por ejemplo*, Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. Se puede llevar a cabo la Síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o automatizadas. Se puede llevar a cabo la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) usando la instrucciones del fabricante. Algunas porciones de dichos anticuerpos, polipéptidos u oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el producto deseado.

40 **1. Aislamiento del ADN que codifica un polipéptido**

[0195] Se puede obtener el ADN que codifica un polipéptido de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se piensa que posee dicho anticuerpo, polipéptido u oligopéptido de ARNm y expresa éste a un nivel detectable. De acuerdo con esto, el ADN que codifica dichos polipéptidos se puede obtener convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, una biblioteca genómica o mediante procedimientos conocidos (*por ejemplo*, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

[0196] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés p la proteína codificada por éste. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos normalizados, tales como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Alternativamente, se puede usar la metodología de la PCR [Sambrook y col., más arriba: Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

55 **[0197]** Se conocen bien en la materia las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas de tal manera que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferiblemente de tal manera que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos de marcado, e incluyen el uso de radiomarcas del tipo de ARP marcado con ³²P, la biotilación o el marcado con enzimas. En Sambrook y col., más arriba se proporcionan condiciones de hibridación, que incluyen rigor moderado y rigor elevado.

[0198] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. Se puede determinar la identidad de la secuencia (a cualquier nivel de aminoácido o nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia

de longitud completa, usando procedimientos conocidos en la técnica tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0199] Se puede obtener el ácido nucleico que tiene la secuencia que codifica la proteína cribando el ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida dada a conocer en la presente memoria descriptiva por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión de cebadores tal como se describe en Sambrook y col., más arriba, para detectar precursores y procesar intermedios del ARNm que no se pueden transcribir de manera inversa en el ADNc.

10 **2. Selección y transformación de células hospedadoras**

[0200] Las células hospedadoras se transfectaron o transformaron con los vectores de expresión o de clonación descritos en la presente memoria descriptiva para la producción del polipéptido de LY6 y se cultivaron en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codificaban las secuencias deseadas. El técnico experto puede seleccionar las condiciones del cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, sin experimentación innecesaria. En general, los principios, los protocolos, y las técnicas principales para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., más arriba.

[0201] La persona normalmente experta conoce los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, y electroporación mediada por liposomas. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo usando técnicas normalizadas apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook y col., más arriba, o la electroporación, se usa generalmente para los procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de algunas células vegetales, tal como se describe en Shaw y col., Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de Junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). Se han descrito los aspectos generales de las transfecciones en sistemas hospedadores de células de mamíferos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.399.216. Se llevan a cabo normalmente transformaciones en levaduras de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, se pueden usar también otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliomitina. Para las diversas técnicas de transformación de células de mamíferos, véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336: 348-352 (1988).

[0202] Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células procariotas, de levaduras, o de eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Están públicamente disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* k12 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más bien que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido debido a que es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican las proteínas endógenas del hospedador, incluyendo los ejemplos de dichos hospedadores la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA* completo; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA ptr3* completo; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección de *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.946.783 otorgada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados los procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, la PCR u otras reacciones de la polimerasa con el ácido nucleico.

[0203] Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, y proteínas de fusión de anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocombinado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más económica. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos U.S.

5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.), y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Tras la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, *por ejemplo*, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado en células adecuadas (*por ejemplo*, células CHO).

[0204] Además de los procariontes, los microbios eucariotes, tales como los hongos filamentosos o las levaduras son adecuados hospedadores de clonación o expresión de los vectores que codifican los polipéptidos deseados. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de los Estados Unidos N° 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tal como, *por ejemplo*, *K. lactis* (documentos MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154 (2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de Octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, *por ejemplo*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilótropicas son adecuadas en la presente memoria descriptiva e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Se puede encontrar una lista de levaduras específicas que son a modo de ejemplo de este tipo de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982).

[0205] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de la producción de polipéptidos glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y células hospedadoras de insectos permisivas procedentes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles una variedad de cepas víricas para la transfección, *por ejemplo*, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y se pueden usar dichos virus como los virus en la presente memoria descriptiva, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0206] Sin embargo, hay un gran interés en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo de tejidos) ha llegado a ser un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de ratas Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2)

[0207] Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción del polipéptido deseado y cultivados en medios nutrientes convencionales según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

[0208] El ácido nucleico (*por ejemplo*, ADNc o ADN genómico) que codifica el polipéptido de LY6 respectivo se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Están públicamente disponibles diversos vectores. El vector puede, *por ejemplo*, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un(os) sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligadura normalizadas que el

técnico experto conoce.

[0209] Se puede producir el polipéptido deseado de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componentes del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica la secuencia madura que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o las líderes de la enterotoxina II térmicamente estable. Para la secreción de la levadura, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la líder de la invertasa de la levadura, la líder del factor alfa (que incluye las líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, descritas posteriormente en la Patente de los Estados Unidos N° 5.010.182, o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179, publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, se pueden usar secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tal como las secuencias señal procedentes de los polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como las líderes secretorias víricas.

[0210] Ambos vectores, de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y algunos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV p BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

[0211] Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, *por ejemplo*, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

[0212] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados de células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación de ácido nucleico que codifican la proteína deseada, tal como DHFR o la timidina cinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea el DHFR natural en la línea de células CHO deficiente en la actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para el uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura [Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

[0213] Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor unido de manera operable a la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada, con el fin de dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien los promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y de la lactosa [Chang y col., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281: 544 (1979)], el sistema promotor de la fosfatasa alcalina y el triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776], y los promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida de manera operable al ADN que codifica la secuencia de la proteína deseada.

[0214] Los ejemplos de secuencias promotoras deseadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otros enzimas glicolíticos [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucos-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfogluconasa isomerasa, y glucocinasa.

[0215] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del hidrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

[0216] La transcripción del ADN en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela (documento UK

2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 de Simios (SV40), procedentes de promotores de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

[0217] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el polipéptido deseado insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elemento del ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los potenciadores incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado posterior del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia de codificación de las secuencias de aminoácidos anteriores, pero se localiza preferentemente en el sitio 5' desde el promotor.

[0218] La expresión de los vectores usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, seres humanos, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', sin traducir de ADN eucariotas o víricos o de ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica en anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo descrito en esta sección.

[0219] Otros procedimientos vectores, y células hospedadoras adicionales adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo en cultivos celulares recombinantes de vertebrados se describen en Gething y col., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281: 40-46 (1979); documento EP 117.060; y documento EP 117.058.

4. Cultivo de células hospedadoras

[0220] Las células hospedadoras usadas para producir el polipéptido de LY6 se pueden cultivar en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem.102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINJ), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en las concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incluir también cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son aquellas anteriormente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para las personas normalmente expertas en la técnica.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

[0221] Se pueden medir la amplificación y/o la expresión génica en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], inmunotransferencia (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dupletes específicos, incluyendo dupletes de ADN, dupletes de ARN, y dupletes híbridos de ADN-ARN o dupletes de ADN-proteínas. Los anticuerpos, a su vez, se pueden marcar y se puede llevar a cabo el ensayo en el que el duplete se une a una superficie, de tal manera que tras la formación del duplete sobre la superficie, se pueda detectar el anticuerpo unido al duplete.

[0222] Se puede medir, alternativamente, la expresión génica mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos adecuados para el presente procedimiento se pueden

preparar contra un polipéptido u oligopéptido de secuencia natural, o contra una secuencia exógena fusionada al ADN y que codifica un epítipo del anticuerpo específico de dicho polipéptido u oligopéptido.

6. Purificación de la proteína

5 [0223] Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células hospedadoras. Si están unidos a membrana, se pueden liberar de la membrana usando una disolución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anterior se pueden perturbar mediante diversos medios físicos o químicos, tales como criocongelación, ciclación, sonicación, 10 perturbación mecánica, o agentes de lisis celular.

[0224] Puede ser deseable purificar el anterior a partir de las proteínas o polipéptidos de célula recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de los procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol; HPLC en fase inversa 15 cromatografía en gel de sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, columnas de Sephadex G-75, proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes metálicas para unir las formas etiquetadas a epítopos de las moléculas deseadas. Se pueden emplear diversos procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, 20 Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido concreto producido por los procedimientos reivindicados.

25 [0225] Cuando se usan técnicas recombinante, se puede producir el polipéptido de LY6 intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si dichas moléculas se producen intracelularmente, como una primera etapa, el desecho particulado, tanto de las células hospedadoras como de los fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. De 30 manera breve, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar generalmente usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un 35 inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

[0226] La purificación se puede producir usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La 40 adecuabilidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. Se puede usar la proteína A para purificar los anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para las $\gamma 3$ humanas (Guss y col., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad se une es lo más a menudo agarosa, pero están 45 disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como las de vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinilo)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que se pueden conseguir con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABXJ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Están también disponibles otras técnicas par la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC en Fase 50 Inversa, la cromatografía en gel de sílice, la cromatografía en heparina SEFAROSAJ, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), la cromatofocalización, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

[0227] Tras cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los 55 contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, llevada a cabo preferiblemente a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

H. Formulaciones farmacéuticas

60 [0228] Las formulaciones terapéuticas ("agente terapéutico" usadas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar para el almacenamiento mezclando el(los) agente(s) terapéutico(s) que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science of Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennaro, A. y col., Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)), 65 en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen

tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio), cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, tónicos tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos de Zn-proteínas); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN7, PLURONICS7 o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferiblemente entre 10-100 mg/ml.

[0229] Las formulaciones de la presente memoria descriptiva pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además del(de los) agente(s) terapéutico(s) anterior(es), puede ser deseable incluir en la formulación, un anticuerpo adicional, *por ejemplo*, un segundo agente terapéutico mencionado, o un anticuerpo para alguna otra diana tal como el factor de crecimiento que afecta el crecimiento del glioma. Alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0230] Los ingredientes activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de polimetacrilato de metilo, respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, *más arriba*.

[0231] Se pueden preparar preparaciones de liberación continua. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, polimetacrilato de 2-hidroxietilo, o alcohol poli(vinílico), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT7 (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

[0232] Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Procedimientos para el diagnóstico y/o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino

[0233] Para determinar la expresión de LY6 en el tejido o las células gastrointestinales de un mamífero, tal como un mamífero que experimenta la IBD, están disponibles diversos ensayos diagnósticos. Se puede analizar la expresión en exceso del polipéptido de LY6 mediante la RT-PCR, la hibridación in situ, el análisis de micromatriz, y/o la inmunohistoquímica (IHC). Secciones de tejido incluidas en parafina reciente y/o congelada procedentes de una biopsia gastrointestinal (tal como de colon o, más específicamente, del colon sigmoideo) de un mamífero (tal como, sin limitación, un ser humano) se pueden someter a la RT-PCR, la hibridación in situ, el análisis de micromatriz y o el ensayo IHC.

[0234] Alternativa o, adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos FISH tales como INFORM7 (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION7 (Vysis, Illinois) en formalina fijada, tejido incluido en parafina para determinar la extensión (si acaso) de la expresión de LY6 y/o la regulación en exceso en una muestra o biopsia de tejido.

[0235] Se puede evaluar la expresión de LY6 usando un ensayo diagnóstico *in vivo*, *por ejemplo*, administrando una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica) que se une a la molécula que se va a detectar y se etiqueta con una marca detectable (*por ejemplo*, un isótopo radioactivo o una marca fluorescente) y se hace un barrido externo al paciente para la localización de la marca.

[0236] Actualmente, dependiendo de la etapa de la IBD, el tratamiento implica una terapia o una combinación de las siguientes terapias, cirugía para eliminar el tejido del intestino afectado, administración de agentes terapéuticos, incluyendo sin limitación la quimioterapia, cambios en la dieta, y una gestión del estilo de vida: Se conocen en la técnica los agentes terapéuticos o los agentes quimioterapéuticos útiles en el tratamiento de la IBD y se dan a conocer en la presente memoria descriptiva los agentes terapéuticos y quimioterapéuticos representativos

[0237] En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y los derivados modificados (véase, por ejemplo, el documento EP0600517). El anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica anterior se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. Dicho anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica se administra junto con la quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. Las Physicians Desk Reference (PDR) dan a conocer las dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer concreto que se está tratando, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para el profesional experto en la técnica y se pueden determinar por el médico.

[0238] Los agentes terapéuticos o los agentes quimioterapéuticos se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intracraneal, intracerebroespinal, intraarticular, intratecal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, oral, tópica, o de inhalación.

[0239] Se dan a conocer en la presente memoria descriptiva procedimientos que implican una etapa diagnóstica y una etapa de tratamiento terapéutico. En una realización, la presente invención proporciona procedimientos para detectar la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) en un sujeto mamífero que incluyen las etapas de (1) detectar el nivel de expresión de un ácido nucleico o de un gen que codifica un polipéptido de LY6 (a) en una muestra de ensayo de tejido o células obtenidas del sujeto, y (b) en una muestra del control en la que un nivel mayor de expresión del ácido nucleico o del gen LY6 en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra del control, indica la presencia de una IBD en el sujeto a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo; se dan a conocer en la presente memoria descriptiva diversas moléculas asociadas a la IBD que se expresan de manera diferente en la IBD, por ejemplo, una molécula que se expresa de manera diferente en una IBD o se expresa en exceso en una IBD. La molécula asociada a la IBD expresada en exceso puede ser una tal como la integrina, beta 7 (ITGB2) (véase el documento 2006/026759). El término "agente terapéutico de la IBD" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un antagonista de una molécula asociada con la IBD tal como un antagonista de una integrina, por ejemplo, un antagonista de ITGB7. El agente terapéutico de la IBD puede ser un antagonista del polipéptido que se muestra como SEQ ID NO: 69 codificado por la secuencia de ácido nucleico que se muestra como SEQ ID NO: 68.

J. Artículos de fabricación y kits

[0240] Para las aplicaciones diagnósticas, el artículo de la fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente que indica un uso para la detección y la expresión de LY6 (tal como, sin limitación LY6, LYPD1, LYPD3, y/o LYPD5) en un tejido o célula gastrointestinal de un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano. En una realización, el tejido o la célula es un tejido o una célula gastrointestinal. En una realización, la detección incluye la cuantificación respecto a una muestra del control. En una realización, el recipiente, etiqueta o prospecto indica que el tejido o las células gastrointestinales son del colon de un mamífero. En una realización, el recipiente, la etiqueta o el prospecto indican que la expresión creciente de LY6 con respecto a una muestra del control es indicadora de la IBD, incluyendo, sin limitación la CD y/o la UC, en el mamífero. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Adicionalmente, el artículo de la fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón u otro reactivo (tal como una marca detectable) útil para llevar a cabo la detección. Este puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, y colorantes.

[0241] Para el aislamiento y la purificación del polipéptido de LY6, el kit puede contener el reactivo de unión a LY6 acoplado a perlas (*por ejemplo*, perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen dichas moléculas para la detección y la cuantificación del polipéptido de LY6 *in vitro*, *por ejemplo*, en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de la fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociada con el recipiente. El recipiente mantiene una composición que comprende al menos uno de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica de unión a LY6 utilizable con la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contengan, *por ejemplo*, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como las instrucciones para el uso previsto *in vitro* o diagnóstico.

K. Ácidos nucleicos que codifican LY6 de sentido directo y de sentido contrario

[0242] Las moléculas que se esperaría que se unieran a los ácidos nucleicos que codifican un gen LY6 incluyen oligonucleótidos de sentido directo y de sentido contrario, que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (tanto ARN como ADN) capaz de unirse a las secuencias diana de ARNm o ADN de LY6. Los oligonucleótidos de sentido contrario o de sentido directo, comprenden un fragmento de la región de codificación del ADN de LY6 o su complemento: La capacidad para derivar un oligonucleótido de sentido contrario o de sentido directo, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48: 2659, 1988) y van der Krol y col. (BioTechniques 6: 958, 1988).

[0243] Los oligonucleótidos de sentido directo y/o de sentido contrario hibridables a un gen LY6 son útiles, por ejemplo, para detectar la presencia de ADN o ARNm de LY6 en una muestra de tejido o células gastrointestinales de un mamífero de acuerdo con la invención. Los compuestos de sentido directo y/o de sentido contrario usados de acuerdo con esta invención se pueden preparar de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se adquiere de diversos suministradores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede emplear de manera adicional o alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados. Los compuestos dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden también premezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra forma con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes que enseñan la preparación de dicha captación, distribución y/o absorción, ayudando a las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

[0244] Los oligonucleótidos de sentido directo y sentido contrario incluyen sin limitación los cebadores y sondas útiles en la PCR, RT-PCR, procedimientos de hibridación, hibridación in situ, y similares.

[0245] Otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido directo o sentido contrario incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10048, y otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tales como poli-(L-lisina). Aún más, se pueden añadir agentes intercalantes tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a los oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido de sentido contrario o de sentido directo para la secuencia del nucleótido diana.

[0246] Las moléculas de ARN o ADN de sentido contrario o sentido directo son generalmente al menos aproximadamente de 5 nucleótidos de longitud, de manera alternativa al menos aproximadamente de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos un 10 % de la longitud de referencia.

40

EJEMPLOS

[0247] Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan con objetivos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Reactivos comercialmente disponibles denominados como en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indique otra cosa. La fuente de las líneas celulares se identificó en los siguientes ejemplos, y/o a lo largo de la memoria descriptiva, mediante los números de acceso de la ATCC que es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

45

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

50

[0248] *Reactivos, células y ratones:* se obtuvieron IFN γ , TNF α , e IL1 β de Peprotech™ (Rocky Hill, NJ). Se obtuvo IFN α de Hycult Biotechnology™ (Países Bajos). Para los experimentos de reticulación, se obtuvieron el anticuerpo dirigido contra el control de KLH, y anti LY6A (clon E13-161.7 o D7) de Pharmingen™ (San Diego, CA). Se obtuvo anti-LY6C (clon HK1.4) de Southern Biotech™ (Birmingham, AL).

55

[0249] Se indujo la colitis crónica mediante transferencia de CD45RB^{high} tal como se ha descrito anteriormente en ratones SCID en un fondo Balb/c (Powrie, F. y col., (1994) Immunity 1:553-562). Ratones IL10^{-/-} (Kuhn, R. y col., (1993) Cell 75: 263-274) sobre 129 fondos, que desarrollan colitis espontánea, se sacrificaron a entre 11 y 13 semanas de edad. Los colonos se congelaron rápidamente en OCT hasta que se usaron en los experimentos tal como se ha descrito. El colon proximal, el colon medio, el colon distal y el recto se puntuaron usando una escala de 0-5 (0 = intestino normal, 5 = enfermedad grave). Se sumaron las puntuaciones para conseguir una puntuación total de gravedad de la colitis para cada animal.

60

[0250] Se derivó la línea celular de colonocitos de ratón adulto joven (YAMC) (proporcionada por Robert Whitehead, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN) del Immortomouse™, un animal transgénico que contenía un antígeno T sensible a la temperatura (tsTag) bajo el control de un promotor dependiente del interferón γ ,

65

tal como se ha descrito anteriormente (Whitehead, R.H. y col, (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90 :587-591). Las células YAMC proliferan en condiciones permisivas de 32 °C en presencia de 5 unidades/ml de IFN-7 (Peprotech™, New Jersey), pero no proliferan más tras la retirada de IFN γ a 37 °C (condiciones no permisivas).

- 5 **[0251]** Las células YAMC se cultivaron en RPMI que contenía FBS al 5 %, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina, 5 U/ml de IFN γ y suplemento N-2 (Invitrogen™, Carlsbad, CA). Se cultivaron las células en condiciones no permisivas durante 24 horas antes de los experimentos, y durante la duración de la experimentación.
- 10 **[0252]** Se obtuvieron células CMT93 de la ATCC (Número ATCC®, CCL-223™, ATCC, Manassas, VA) cultivadas en DMEM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, y penicilina/estreptomicina.

[0253] *Microscopio de captura láser y purificación del ARN:* se aplicaron secciones de 10-12 μ m a portas con membrana LCM (Molecular Machines™, Glattbrugg, Suiza). Se sometieron los portas a una tinción H&E abreviada

- 15 (tiempo total de aproximadamente cinco minutos) antes de que se identificaran histológicamente las células epiteliales de la cripta y se diseccionaron usando un microscopio MMI Cellcut™ (Molecular Machines™, Glattbrugg, Suiza). Se purificó el ARN a partir de las células diseccionadas usando el kit de purificación del ARN Arcturus™ Picopure y los protocolos del fabricante (Arcturus™, Sunnyvale, CA) y se cuantificó usando el Espectrofotómetro™ NanoDrop ND-1000™ (NanoDrop Technologies™, Wilmington, DE).

- 20 **[0254]** Hibridación de micromatriz y análisis de datos: Se determinó la cantidad y la calidad de la entrada de muestras de ARN total usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop™ Technologies, Montchanin, DE) y Bioanalyzer 2100™ (Agilent™ Technologies, Palo Alto, CA), respectivamente. Agilent™ Technologies (Palo Alto, CA) proporcionó el procedimiento de preparación del ARNc marcado con colorante Cy y la hibridación de la matriz.

- 25 De manera breve, la muestra de ARN total se convirtió en ADNc bicatenario y a continuación en ARN marcado usando un Kit Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification™ (Agilent™, Product nº 5184-3523). El ARNc marcado se purificó usando el mini kit RNeasy™ (Qiagen™, San Diego, CA) y a continuación se cuantificó usando el espectrofotómetro ND-1000™ (Nanodrop™ Technologies). Se determinó la incorporación del colorante Cy haciendo

- 30 avanzar el ARNc marcado en un gel de TBE-Urea Novex™ (Invitrogen™, Carlsbad, CA) seguido por el barrido del gel en un escáner Typhoon™ (GE Healthcare™, Piscataway, NJ). Para determinar la cantidad de cuentas fluorescentes del colorante Cy, se analizaron las imágenes del gel usando el software ImageQuant™ (GE Healthcare™). Aproximadamente, 500.000 cuentas del ARNc marcado con el colorante Cy se fragmentaron y se

- 35 hibridaron con la matriz del genoma completo de ratón de Agilent tal como se describe en el Kit-plus de Hibridación In situ de Agilent (Agilent™, Product nº 5184-3568). Las muestra de LCM se marcaron con colorante Cy5 y se hibridaron frente a la referencia de ratón universal marcado con el colorante Cy3 (Stratagene™, La Jolla, CA). Tras la hibridación, se lavaron las matrices, se secaron con acetónitrilo, y se barrieron en el escáner de micromatriz del ADN de Agilent™. Se analizaron los archivos de imágenes de la matriz usando la versión 7.5 del software Feature Extraction™ de Agilent™ y se llevó a cabo un análisis de datos adicional usando Resolver™ (Merck™, Seattle, WA).

- 40 **[0255]** Se analizaron los datos usando el software Rosetta Resolver™ (Rosetta Biosoftware™, Seattle, WA). De $\Delta\Delta$ manera breve, se agruparon las muestras sanas y colíticas por separado y se seleccionaron sondas que pasaron dos Anova personalizados ($p < 0,05$). Estas sondas se analizaron adicionalmente para las sondas que demostraron un cambio de dos veces o más en las muestras colíticas frente a las muestras sanas.

- 45 **[0256]** *RT-PCR cuantitativa en tiempo real:* se llevó a cabo la RT-PCR sobre ARN extraído usando el kit y los reactivos Taqman™ Gold™ RT-PCR (Applied Biosystems™, Foster City, CA). Todas las muestras se hicieron avanzar con cebadores específicos del gen usando sondas internas marcadas con 5'-FAM y 3'-TAMRA. Se llevó a cabo el análisis en comparación con el gen doméstico, SPF32, cebadores específicos mediante el procedimiento 2- $\Delta\Delta$ Ct tal como se describe (Livak, K.J., y T.D. Schmittgen (2001) Methods 25: 402-408). Los cebadores y las sondas
- 50 se diseñaron usando tanto el software Primer3™ (Rozen, S., y H. Skaletsky (2000) Methods Mol Biol 132: 365-386) como se obtuvieron comercialmente (Applied Biosystems™). Los cebadores y las sondas usados para estos ensayos fueron los siguientes, que se muestran en la dirección 5'-3'.

LY6A

- 55 Sentido directo: CTT ACC CAT CTG CCC TCC TA (SEQ ID NO: 39)
 Sentido contrario: CCT CCA TTG GGA ACT GCT AC (SEQ ID NO: 40)
 Sonda: TCC TGT TGC CAG GAA GAC CTC TGC (SEQ ID NO: 41)

60 LY6C

- Sentido directo: ACT TCC TGC CCA GCA GTT AC (SEQ ID NO: 42)
 Sentido contrario: GGC ACT GAC GGG TCT TTA GT (SEQ ID NO: 43)
 Sonda: CTG CCG CGC CTC TGA TGG AT (SEQ ID NO: 44)

[0257] *Tinción inmunofluorescente:* Tejidos congelados se cortaron en secciones de 5 µm y se tiñeron con anti LY6C biotinilado (Southern Biotech™, Birmingham, AL) o anti-SCA-a a 2,5 ng/ml (R&D Systems™, Minneapolis, MN). Se lavaron los portos y se marcaron con Alexa Fluor™ 488 y se conjugaron, se montaron usando Prolong Gold™ con DAPI (Invitrogen™, Carlsbad, CA) y se visualizaron mediante microscopio confocal.

5

[0258] *Moléculas de LY6 reticulantes:* Se probó la capacidad del polipéptido de LY6 reticulado para efectuar la producción de quimiocina incubando células YAMC con anticuerpos dirigidos contra LY6c o contra KLH (control) unidos a placa y midiendo la producción de quimiocinas CXCL2, CXCL5, y CCL7. Debido a que se requiere la formación de una balsa lipídica en la membrana celular para la reticulación, se probó la producción de quimiocina en condiciones normales de formación de la balsa lipídica (sin agotamiento del colesterol) y en condiciones de agotamiento del colesterol.

[0259] Para la reticulación usando anticuerpos unidos a placa, se añadieron 100 µl de anticuerpo dirigido contra LY6C i contra KLH (control) a 5 µg/ml de concentración a una placa de 96 pocillos, o se añadieron 2 ml a una placa de 60 mm² y se dejó que se unieran a la placa durante 15 horas a 4 °C. Se incubaron células YAMC, que crecían en condiciones de agotamiento de colesterol o sin agotamiento del mismo (tal como se proporciona en el Ejemplo 5, en la presente memoria descriptiva), con los anticuerpos unidos a placa durante 15 horas a 32 °C en condiciones sin agotamiento del colesterol. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7. Se describe el ensayo adicionalmente y se muestran los resultados en el Ejemplo 5, en la presente memoria descriptiva.

[0260] *Inhibición del ARNip:* Se obtuvo ARNip individual dirigido contra LY6C de murino de Dharmacon (Lafayette, CO). El ARNip se transfectó en células YAMC usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) y protocolos normalizados. 72 horas después de la transfección, se recogieron las células para determinar la eficacia de desactivación. Se seleccionó un ARNip para los experimentos de reticulación basándose en la superior eficacia de desactivación (95 % de inhibición mediante RT-PCR)

[0261] *Secreción de CXCL5:* Se recogieron los sobrenadantes y en el punto temporal indicado de las células estimuladas se determinaron las concentraciones de citocina y CXCL5 mediante ELISA usando un kit comercialmente disponible de R&D Systems™ y los protocolos del fabricante. El nivel de detección fue de 15 pg/ml de CXCL5.

[0262] *Agotamiento del colesterol:* Se cultivaron células YAMC durante 72 horas en medio exento de suero a 37 °C en presencia de lovastatina 4 µM y mevalonato 250 µM (Sigma). Se plaquearon las células y se mantuvieron en lovastatina y mevalonato a lo largo del experimento.

[0263] Estadística: Se usó el test de la t de Student para la comparación entre grupos (* indica p<0,05)

Ejemplo 2: los modelos de expresión génica de las IEC están alterados durante la colitis

40

[0264] Los estudios han indicado que los modelos de expresión génica de las IEC están significativamente alterados en modelos de colitis en ratón, así como en la IBD humana (Fahlgren, A., y col. (2004) Clin Exp Immunol 137: 379-385; Brand, S. y col. (2006) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G827-838; Ruiz, P.A. y col. (2005) J Immunol 174: 2990-2999). En este ejemplo, se los modelos de expresión génica evaluados en IEC de ratones sanos y colíticos se examinaron con el fin de iluminar novedosos genes y rutas alteradas en la IBD.

[0265] La identificación de los genes implicados en la inmunopatología de la IBD se investigó evaluando la células epiteliales intestinales (IEC) del modelo de colitis en ratón por transferencia de linfocitos T CD45RB^{HI} así como el modelo IL10^{-/-} de ratón, ambos de los cuales dan como resultado la desregulación de Th1 y compartes muchas características de la enfermedad de Crohn (Elson, C.O. y col. (2005) Immunol Rev 206: 260-276; Bouma, G., y W. Strober (2003) Nat Rev Immunol 3: 521-533). Se usó la microdissección mediante captura laser (LCM) para aislar las IEC de la cripta de los colonos de ratones sanos y colíticos en los dos modelos de la IBD de murino. Se extrajo el ARN de estas muestras y se analizó mediante tecnología de micromatriz tal como se describe en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 1. El perfil de la expresión génica de las IEC de ratones colíticos en el modelo de colitis por transferencia identificó 1770 sondas con cambios de expresión > 2 veces en comparación con los ratones del control, mientras que el modelo IL10^{-/-} identificó 1140 sondas. El solapamiento en ambos modelos dio como resultado 540 sondas con cambios de expresión > 2 veces, correspondientes a aproximadamente 400 genes diferentes (no se muestran los datos).

Ejemplo 3: Rutas y genes afectados en las IEC durante la colitis

[0266] De los aproximadamente 400 genes afectados en ambos modelos, los genes implicados en la presentación del antígeno, la señalización de TLR y la migración celular estaban representados en exceso (Tabla 7). En la Tabla 7, los números representan el promedio con la desviación estándar del cambio de veces en comparación con el ARN patrón universal de los ratones colíticos sobre los ratones sanos en cualquiera del modelo IL10^{-/-} de colitis o del

65

modelo CD45RB^{HI} de colitis, tal como se indicó. Los resultados indicaron que algunos genes que expresaron las IEC mostraron modelos de expresión alterados en modelos de murino de la IBD. Muchos de estos genes, incluyendo TLR2, CCL7, CXCL5 e ICAM-1 se han descrito anteriormente como teniendo una creciente expresión epitelial durante la colitis (Breider, M.A. y col. (1997) Vet Pathol 34: 598-604; Ugucioni, M. y col. (1999) Am J Pathol 155: 331-336; Z'Graggen, K. y col. (1997) Gastroenterology 113: 808-816; Singh, J.C. y col. (2005) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288: G514-524), lo que sugiere que el modelo de expresión génica obtenido es estas micromatrices es una reflexión precisa de la biología de las IEC en colitis.

Tabla 7

Cambio de veces (valor p):		
Migración celular	Modelo IL10 ^{-/-}	Modelo CD45RB ^{hi}
CXCL1	+ 3,89 (<0,0001)	+ 2,09 (0,00066)
CXCL5	+ 21,82 (<0,0001)	+ 23,34 (<0,0001)
CXCL13	+ 3,01 (<0,0001)	+ 2,85 (<0,0001)
CCL6	- 3,47 (<0,0001)	- 2,5 (<0,0001)
CCL7	+ 4,2 (<0,0001)	+ 5,54 (0,00026)
CCL11	- 3,43 (<0,0001)	- 3,6 (0,00607)
Señalización de TRL		
TLR2	+ 2,15 (<0,0001)	+ 2,68 (<0,0001)
Fos	+ 3,64 (<0,0001)	+ 2,03 (<0,0001)
LBP	+ 2,34 (<0,0001)	+ 2,57 (<0,0001)
NFKBIA	+ 2,37 (<0,0001)	+ 2,15 (<0,0001)
Presentación del antígeno		
H2-D1	+ 2,77 (<0,0001)	+ 2,23 (<0,0001)
HLA-A	+ 2,83 (<0,0001)	+ 2,40 (<0,0001)
HLA-B	+ 2,71 (<0,0001)	+ 2,44 (<0,0001)
HLA-E	+ 2,3 (<0,0001)	+ 2,34 (<0,0001)
ICAM-1	+ 2,51 (<0,0001)	+ 2,587 (<0,0001)
PSMB8	+ 8,10 (<0,0001)	+ 3,09 (<0,0001)
PSMB9	+ 6,61 (<0,0001)	+ 2,72 (<0,0001)
TAP 1	+ 4,05 (<0,0001)	+ 4,10 (<0,0001)
TAP2	+ 2,08 (<0,0001)	+ 2,18 (<0,0001)

10

[0267] Las IEC pueden funcionar como APC no profesionales (Snoeck, V. y col., (2005) Microbes Infect 7: 997-1004; y Shao, L y col., (2005) Immunol Rev 206: 160-176), y el modelo de expresión génica obtenido en estas micromatrices indica que estas funciones están potenciadas durante la colitis mediante la regulación en exceso en los genes asociados con el procesamiento del antígeno, tales como LMP7 y TAP1, así como en los genes MHC de clase I y II que servirían para potenciar la presentación de antígenos en la superficie de las IEC.

15

[0268] Los datos de la micromatriz apoyan el concepto de que las IEC atraen las células inmunes del colon mediante la expresión alterada de la quimiocina, y pueden presentar el antígeno a los linfocitos T infiltradores regulando en exceso la expresión de los genes asociados con la presentación del antígeno.

20

Ejemplo 4. La expresión de los miembros de la familia LY6 está fuertemente regulada en exceso en la superficie de las IEC colíticas

25

[0269] Los miembros de la familia de moléculas de LY6 de ratón se sobrerrepresentaron en el número así como en el grado de regulación en exceso en el modelo de colitis por transferencia en ratón y en el modelo IL10^{-/-} de ratón (Figuras 23A y 23B). Estos resultados se confirmaron mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real del ARN de IEC combinado y amplificado en el modelo de colitis por transferencia (no se muestran los datos). La expresión de los miembros de la familia LY6 fue única para el estado de enfermedad, de tal manera que no se expresaron de niveles apreciables de ratones sanos de cualquiera de estos miembros de la familia LY6.

30

[0270] Aunque se conoce la expresión de moléculas LY6 de murino en la superficie de las células de origen hematopoyético, no se ha descrito anteriormente la expresión en las IEC (Bamezai, A. (2004) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 52: 255-266; y Rock, K.L. y col. (1989) Immunol Rev 111: 195-224). La expresión de LY6A y LY6C de murino es detectable en muchas células no epiteliales presentes en el interior del colon, tales como los linfocitos T y los granulocitos. Se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente de LY6A y LY6C de murino en colonos sanos y colíticos. Los niveles de LY6A y LY6C de murino fueron mínimos o ausentes sobre la superficie de las IEC sanas (Figura 24A y 24C respectivamente). La expresión de LY6A y LY6C fue detectable sobre la superficie de las IEC en los colonos de los ratones colíticos (Figura 24B y 24D, respectivamente). No hubo evidencia de polarización tanto de

35

LY6A como de LY6C, y la tinción estuvo presente en las membranas apicales y basolaterales, volviendo a las moléculas de LY6 potencialmente accesibles a los ligandos sobre cualquier superficie. Estos resultados indican que los resultados del análisis de micromatriz muestran una regulación en exceso de LY6A y LY6C de murino en modelos colícticos de murino que no se debió a la influencia de la contaminación de las células inmunes.

5

Ejemplo 4. La transcripción de genes LY6 es estimulada por las citocinas inflamatorias

[0271] Se indujo la expresión de LY6 e linfocitos T y se potenció por los IFN de tipo I y tipo II (Khodadoust, M.M., K.D. Khan, y A.L. Bothwell. 1999. Complex regulation of Ly-6E gene transcription in T cells by IFNs. *J Immunol* 163: 811-819). Además, la expresión de numerosas citocinas, se elevó en el colon durante la colitis activa (Niessner, M., and B.A. Volk. 1995. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101: 428-435).

[0272] Para determinar si las citocinas presentes durante la colitis afecta la transcripción de los miembros de la familia LY6 en las IEC, los inventores trataron células YAMC, una línea IEC de murino inmortalizada condicionalmente, con IL-1 β , IFN β , TNF α , IFN γ o la combinación de TNF α e IFN γ y se analizó la transcripción de todos los genes LY6 de murino identificados mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Tabla 8). De manera breve, se determinaron los niveles de ARNm del miembro indicado de la familia IEC en las IEC mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real después de 15 horas de tratamiento con la citocina indicada. El número representa el cambio de veces (determinado mediante el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$) frente a los medios del control sin tratar. *, P<0,05 frente a los medios del control. †, p<0,05 frente a las células tratadas con IFN γ . Se probaron los siguientes miembros de la familia LY6, pero no se detectaron en las muestras, con respecto al tratamiento: LY6K, Lypd3, Lypd4, Lypd5, LY6g5b, Ly6g6d, Ly6g6e, Slurp1. Los resultados indican que los miembros de la familia LY6 regulan en exceso las IEC en respuesta a las citocinas inflamatorias.

Tabla 8

	Medios	IL1 β	TNF α	IFN α	IFN γ	IFN γ y TNF α
Lv6A	1,0	1,8*	2,2*	2,8*	33,1*	65,4*†
Ly6C	1,0	1,6*	1,2*	2,4*	65,6*	63,6*
Lv6D	1,0	2,7*	2,1*	1,5*	1,0	0,9
Lv6E	1,0	1,4*	1,5*	2,1*	1,9*	2,9*†
Lv6F	1,0	2,5*	0,6*	7,1*	108,2*	169,7*†
Ly6H	1,0	1,0	1,1	1,2	3,7*	1,4†
Lypd1	1,0	1,5*	2,1*	1,3*	1,3*	2,9*†
Lypd2	1,0	0,1*	ND	0,4*	0,1*	ND
Ly6g5c	1,1	1,3	0,8	0,9	1,3	1,1
Ly6g6c	1,0	0,7	0,7	0,6	0,6*	0,3*†
Slurp2/Lynx1	1,1	0,7	0,4	0,7	1,5	0,4*

[0273] Aunque muchos de los miembros de la familia LY6 no se detectaron tanto en presencia como en ausencia de citocinas inflamatorias, los inventores detectaron una fuerte regulación en exceso en la transcripción de LY6A, LY6C y LY6F de murino en respuesta a la mayoría de citocinas ensayadas, así como una regulación en exceso más moderada de LY6E, LY6H y LYPD1 de murino en respuesta a algunas de las citocinas ensayadas. Sin embargo, IFN γ fue de lejos la citocina más potente en la inducción de la regulación en exceso de LY6. Además TNF α potenció los efectos de IFN γ sobre la expresión de LY6A, LY6F, LY6E y LYPD1. Se observó una regulación en exceso similar de los miembros de la familia LY6 en otra línea de IEC de murino, CMT93 (no se muestran los datos).

[0274] Para examinar la expresión superficial de los miembros de la familia LY6 en respuesta a las citocinas, se expusieron células YAMC a las anteriores citocinas y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6A y LY6C de murino, para lo cual están disponibles anticuerpos comerciales, tal como se describe en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 1. Se expresaron niveles elevados de LY6A de murino en células YAMC incluso en ausencia de las citocinas añadidas (Figura 25B, medios). La expresión de LY6C de murino (Figura 25A, medios) fue considerablemente inferior que la expresión de LY6A.

[0275] IL-1 β y TNF α indujeron un ligero aumento en la expresión superficial de LY6A y LY6C de murino, de acuerdo con la expresión del ARN (Figuras 25A y 25B). Se señaló un aumento más moderado en la expresión cuando se añadió IFN α a las células, mientras que IFN γ indujo un drástico aumento en la expresión superficial de LY6A y LY6C (Figura 25A y 25B). La expresión superficial de la proteína se asemejó estrechamente a la expresión del ARN. Las citocinas Th2, tales como IL4, IL10 o IL13 no tuvieron efecto sobre la expresión superficial tanto de LY6A como de LY6C (no se muestran los datos)

50

[0276] La inducción de LY6A (Figura 25D) y LY6C (Figura 25C) por IFN γ fue dependiente de la dosis. Dosis tan bajas como 6,25 unidades/ml de IFN γ dieron como resultado aumentos detectables en ambas moléculas de LY6 mediante citometría de flujo. Además, el aumento en LY6A (Figura 25F) y LY6C (Figura 25E) de la expresión

superficial llegó a ser evidente entre 2 y 4 horas después del tratamiento con IFN γ , y aumentó de manera continuada durante al menos 24 horas después del tratamiento con IFN γ . Estos datos indican que concentraciones relativamente bajas de IFN γ son suficientes para aumentar la expresión superficial de las moléculas de LY6 en horas.

5

[0277] Existe evidencia de que IL-22, que se secreta principalmente a partir de linfocitos T activados, funciona a través del complejo IL-22R, presente en las IEC para promover la producción de citocinas y un fenotipo inflamatorio (Brand, S.F. y col. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G827-838 (2006)). Además IL-22 está implicada en la inmunopatogénesis de la enfermedad de Crohn. Para examinar si IL-22 afecta a la expresión de la molécula de LY6 en IEC de murino, se cultivaron células YAMC en presencia de IL-22 y se analizaron para la expresión de LY6C (Figura 25G) y LY6A (Figura 25H). Ambas moléculas de LY6 aumentaron sustancialmente en presencia de IL-22 a niveles comparables a la inducción que se observa tras el tratamiento con IFN γ .

10

[0278] Para asegurar que la regulación en exceso de moléculas de LY6 no fue específica para la línea de células YAMC, se examinaron los niveles de LY6A y LY6C de murino en la línea CMT93 de células tumorales epiteliales colónicas de murino. Los niveles de LY6A de murino y LY6C de murino se regularon en exceso tras el tratamiento con IFN γ (Figura 25I). Se piensa que los niveles de regulación en exceso de moléculas de LY6 fueron más modestos en células CMT93, el análisis de citometría de flujo indicó que los niveles fueron bastante elevados incluso en células sin tratar (no se muestran los datos), que es probablemente un resultado del fenotipo tumoral de las células CMT93.

15

[0279] Estos datos apoyan los datos obtenidos mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real en la confirmación de que los miembros de la familia LY6 regulan en exceso las IEC en respuesta a las citocinas inflamatorias.

25 **Ejemplo 5: La estimulación por LY6 de las IEC se asocia con la formación de una balsa lipídica**

[0280] A diferencia de las proteínas ancladas a GPI, los miembros de la familia LY6 no poseen un único dominio intracelular asociado con una señalización tradicional exterior-interior. Más bien, están presentes en el interior de microdominios con balsa lipídica (Bohuslav, J. y col. *Eur J Immunol* 23: 825-831 (1993)). Sin embargo, se ha sugerido que la reticulación de los miembros de la familia LY6 en la superficie de las células da como resultado una redistribución de otras moléculas superficiales celulares así como la reorganización de estructuras de balsas lipídicas, lo que sugiere un mecanismo por el cual las moléculas de LY6 pueden afectar la transducción de la señal y las funciones celulares en la dirección 3'. (Simons, K. y col., *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39 (2000)).

30

[0281] Se han identificado hasta la fecha pocos ligandos para las proteínas LY6, y en la actualidad no se conocen ligandos para LY6A o LY6C (Paret, C. y col., (2005) *Int J Cancer* 115: 724-733; Apostolopoulos, J. y col., (2000) *Immunity* 12: 223-232; y Classon, B.J. (2001) *Trends Immunol.* 22: 126-127). Se requiere colesterol para mantener la integridad de la balsa lipídica (Simons, K., y col. *J Clin Invest* 110: 597-603 (2002)), y se usa a menudo el agotamiento del colesterol para inhibir la biosíntesis *in vitro* de la balsa lipídica (von Tresckow, B. y col. *J Immunol* 172: 4324-4331 (2004)).

35

40

[0282] Para analizar si se produce la reorganización de la balsa lipídica en las IEC en respuesta a la reticulación de LY6, se hicieron crecer células YAMC en condiciones de agotamiento del colesterol (condiciones en las que las balsas lipídicas se agotan en las células) y en condiciones sin agotamiento del colesterol (condiciones permisivas para la formación de balsas lipídicas). Para las condiciones de agotamiento del colesterol, se hicieron crecer células YAMC en ausencia de suero y en presencia de lovastatina 4 μ M y mevalonato 0,25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 72 horas a 37 °C. Se usaron las mismas condiciones de crecimiento para células YAMC en condiciones sin agotamiento del colesterol, excepto que no se añadieron lovastatina o mevalonato al medio de crecimiento. A continuación las células se cambiaron de nivel y se reticuló el LY6C tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7.

45

50

[0283] Los resultados de estos estudios indicaron que el agotamiento de la balsa lipídica da como resultado una inhibición de la producción de quimiocina mediada por LY6C. Las Figuras 26A-26C muestran que las células YAMC con el colesterol agotado (barras oscuras) produjeron menos quimiocina que las células que no agotaron el colesterol (barras abiertas). El agotamiento del colesterol afectó la producción de quimiocina en los grupos del control estimulados con anticuerpo dirigido contra KLH, sin tener en cuenta la estimulación del LY6C, sin embargo, la respuesta fue mínima y no en una dirección consistente. Para examinar si el agotamiento del colesterol afectó globalmente la viabilidad celular, los inventores midieron la muerte celular, mediante exclusión 7AAD, y determinaron que el agotamiento del colesterol no afecta significativamente la viabilidad de las células YAMC (92 % de viabilidad frente a 86 % en las células con el colesterol agotado, no se muestran los datos). La expresión superficial de LY6A (Figura 26D) y LY6C (Figura 26E) fue significativamente inferior en las células YAMC con el colesterol agotado, sugiriendo que los niveles de colesterol en la membrana plasmática y la integridad de la balsa lipídica afectan los niveles de expresión de LY6 en la superficie de las células. Estos datos sugieren que la integridad de la balsa lipídica, influenciada por la biosíntesis del colesterol, permiten la expresión de las moléculas de LY6 en la superficie, y está potencialmente implicada en la inducción de las quimiocinas mediada por LY6C. De esta manera, la

55

60

65

potenciación de la producción de quimiocina mediada por la interacción de los polipéptidos LY6C en la membrana celular requiere la presencia de balsas lipídicas sobre la superficie celular.

Ejemplo 6. La reticulación de LY6C da como resultado un aumento en la expresión superficial de las moléculas de LY6

[0284] Se ha informado que la reticulación de LY6C en la superficie de los linfocitos T da como resultado la muda de LY6C (Jaakkola, I. y col. (2003) J Immunol 170: 1283-1290). Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T, cuando el LY6C de murino se reticuló en la superficie de las IEC, no se produjo la muda ni de LY6A ni de LY6C (Figura 27A y 27B, respectivamente. Por el contrario, en ausencia de IFN γ , los niveles de expresión superficial de LY6A y LY6c aumentaron en las IEC con LY6C reticulado, pero no con LY6A. Cuando se preincubaron las IEC con IFN γ , se eliminó mucho de este efecto (Figura 27C), sin embargo, se detectó aún una ligera regulación en exceso de LY6A (Figura 27D).

[0285] Estos datos indican un bucle de retroalimentación positiva en el que la estimulación mediante LY6C sobre las IEC da como resultado un aumento de la expresión superficial de las moléculas de LY6.

Ejemplo 7. Estimulación de los resultados de LY6A en el aumento de la secreción en quimiocinas

[0286] No se han elucidado por completo las funciones de las moléculas de LY6. Para examinar el papel de las moléculas de LY6 en la inmunopatología de la colitis, se estudió la estimulación de las moléculas de LY6 para determinar los efectos sobre la transcripción y la secreción de quimiocinas a partir de las IEC.

[0287] Para analizar la producción de quimiocinas a partir de las IEC en respuesta a la reticulación de moléculas de LY6 de murino, células YAMC, tanto pretratadas con IFN γ como sin tratar, se cultivaron en placas revestidas tanto con anticuerpo control dirigido contra KLH, contra LY6A o contra LY6C. Veinticuatro horas más tarde, se obtuvo el ARNm de estas células y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa para la expresión de CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL25, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL10, CXCL12 y CX3CL1, que son las quimiocinas que se han implicado en la colitis (Tabla 9) (Papadakis, K.A. (2004) Curr Allergy Asthma Rep 4: 83-89; Banks, C. y col., (2003) J Pathol 199: 28-35; y Papadakis, K.A., y S.R. Targan (2000) Inflamm Bowel Dis 6: 303-313). Se llevó a cabo el ensayo en condiciones no permisivas de crecimiento (37 °C en ausencia de IFN γ) para descartar la posibilidad de aumento de la proliferación de IEC en respuesta a la estimulación de IFN γ .

Tabla 9

Pretratamiento > Reticulación >	Medios			IFN		
	Anti-KLH	Anti-LY6A	Anti-LY6C	Anti-KLH	Anti-LY6A	Anti-LY6C
CCL2	1,01 (0,14)	-1,38 (0,13)	8,81 (0,72)	3,53 (0,21)	2,83 (0,21)	16,12 (0,56)
CCL4	1,31 (1,14)	1,83 (0,49)	3,15 (1,17)	5,35 (0,48)	3,65 (0,69)	16,12 (0,56)
CCL5	1,00 (0,10)	1,09 (0,02)	3,31 (0,15)	2,73 (0,13)	2,76 (0,23)	10,13 (0,27)
CCL7	1,00 (0,11)	1,06 (0,08)	3,37 (0,15)	2,82 (0,44)	1,39 (0,33)	5,81 (0,51)
CCL8	1,03 (0,30)	2,05 (0,37)	12,78 (3,14)	74,22 (8,94)	74,44 (9,81)	110,44 (3,36)
CCL25	1,01 (0,16)	1,06 (0,11)	1,16 (0,00)	1,38 (0,36)	1,32 (0,15)	1,46 (0,19)
CXCL1	1,00 (0,07)	-3,17 (0,11)	11,58 (0,12)	-1,13 (0,10)	-1,64 (0,17)	13,36 (0,35)
CXCL2	1,33 (1,10)	ND	21,81 (3,13)	14,30 (3,30)	10,95 (3,05)	113,20 (16,23)
CXCL5	1,08 (0,53)	ND	118,45 (65,14)	1,70 (1,15)	ND	150,99 (55,50)
CXCL10	1,00 (0,05)	1,02 (0,06)	5,11 (0,19)	5,68 (0,31)	5,22 (0,22)	12,22 (0,51)
CXCL12	1,01 (0,14)	1,12 (0,05)	-1,99 (0,14)	-1,11 (0,05)	-1,23 (0,21)	-3,02 (0,06)
CX3CL1	1,00 (0,08)	-1,18 (0,15)	1,92 (0,07)	2,21 (0,11)	1,87 (0,16)	3,22 (0,42)

[0288] Las células pretratadas con IFN γ mostraron regulación en exceso de muchos de estos genes de la quimiocina (véanse medios, grupo contra KLH, frente a IFN γ , grupo contra KLH de la Tabla 9). Sin embargo, con la excepción de una regulación en exceso de CCL8 y una regulación en defecto de CCL1, las células YAMC estimuladas contra LY6A mostraron modelos de expresión génica similares como las células YAMC estimuladas

contra KLH. Sin embargo, las células YAMC estimuladas con anticuerpo dirigido contra LY6C mostraron un aumento de expresión de todas las quimiocinas analizadas excepto para CCL25, que permaneció esencialmente sin cambiar, y CXCL12, que estaba regulada en defecto en respuesta a la estimulación de LY6C. Aunque el aumento de la expresión génica de las quimiocinas inducido por la reticulación de LY6C no fue dependiente de IFN γ , las células pretratadas con IFN γ mostraron un aumento de expresión de las quimiocinas frente a las células que no se habían pretratado con IFN γ .

[0289] Para analizar la cinética de inducción de las quimiocinas inducida por la estimulación de LY6C de murino, se revistieron placas de 96 pocillos con anticuerpos dirigidos contra KLH o anticuerpos monoclonales dirigidos tanto contra LY6A o LY6C. Células YAMC, tanto pretratadas con IFN γ como no, se añadieron durante 24, 48 o 72 horas. En el punto temporal indicado se recogió el ARN para el análisis de la RT-PCR cuantitativa y se recogieron los sobrenadantes para el ELISA.

[0290] En 24 horas, se detectó una espiga en la transcripción de CXCL5 y CCL7 en células con LY6C reticulado pero no con LY6A (Figura 28A). El aumento de expresión de CXCL5 y CCL7 disminuyó en el tiempo pero fue aún detectable después de 72 horas en el cultivo. Se piensa que no se requirió IFN γ para potenciar la transcripción de la quimiocina, IFN γ actuó de manera sinérgica con la estimulación de LY6C en la inducción de la transcripción de CXCL5 y CCL7 en puntos temporales tempranos.

[0291] En paralelo con la expresión génica, los sobrenadantes de LY6C, pero no LY6A, las células reticuladas contuvieron significativamente mayores concentraciones de CXCL5 a las 48 horas (Figura 28B). el efecto fue dependiente de la dosis, y detectable con tan poco como 1 μ g/ml de anticuerpo revestido dirigido contra LY6c. De manera similar a la transcripción, se potenció la secreción de CXCL5 cuando se pretrataron las células con IFN γ , pero no se requirió IFN γ para el efecto. Se señaló también el aumento de secreción de CXCL5 a los puntos temporales de 24 y 72 horas.

[0292] Para asegurar que LY6C estaba implicado en la regulación en exceso observada de las quimiocinas, los inventores usaron ARNip para inactivar LY6C. El transcrito de LY6C se inhibió en un 95 % en ausencia de IFN γ y aproximadamente en un 90 % en presencia de IFN γ mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real que correspondió a niveles significativamente menores de LY6C en la superficie de las células YAMC (no se muestran los datos). Las células con niveles decrecientes de LY6C en la superficie mostraron una respuesta disminuida a la reticulación de LY6C con respecto a la transcripción de las quimiocinas (Figura 28C). La secreción de CXCL5 fue también marcadamente inhibida por la inactivación de LY6C (no se muestran los datos).

[0293] Estos resultados indican que la reticulación de LY6C, pero no de LY6A, en la superficie de las IEC da como resultado un aumento en la secreción de quimiocinas.

Ejemplo 8: Las IEC in vivo muestran una expresión génica de las quimiocinas similar a la de las células estimuladas con LY6C

[0294] Los anteriores datos establecen un modelo en el que las IEC estimuladas mediante LY6C de murino regulan en exceso significativamente la expresión de los genes de la quimiocina.

[0295] El análisis de los datos de micromatriz de las IEC microdisecionadas con captura de láser en modelos de colitis en murino, se examinó la expresión de los mismos 12 genes de la quimiocina en ratones sanos y colíticos en los dos modelos de murino para determinar si las quimiocinas estimuladas por la reticulación de LY6C *in vitro* se correlacionan con las quimiocinas secretadas por la IEC *in vivo* (Figuras 29A y 29B). Se piensa que el modelo de expresión no es idéntico a la regulación en exceso de las quimiocinas resultante de la estimulación de LY6C, la expresión de CXCL5, que fue el gen de la quimiocina más altamente regulado en exceso en los estudios *in vitro*, fue también la quimiocina más regulada en exceso en modelos de colitis en murino, los inventores observaron una regulación en exceso significativa en la expresión de CXCL1, CXCL10, CCL5 y CCL7 en ambos modelos de colitis. Además, los inventores observaron la regulación en exceso de CCL4 y CCL8 en el modelo de colitis por transferencias o en el modelo IL10 $^{-/-}$, respectivamente

[0296] De manera interesante, la única quimiocina que se reguló en defecto como resultado de la estimulación *in vitro* de LY6C de murino, CXCL12, fue también la única de estas quimiocinas reguladas en defecto *in vivo*.

Ejemplo 9: Expresión de genes LY6 humanos en células de colon

[0297] La expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5 humanos en una línea de células de colon humano, se examinaron células Colo 205 (una línea celular derivada de carcinoma de colon humano, ATCCTM con número de acceso CCL-222TM). Las células Colo 205 humanas se trataron con las citocinas IFN-r, LPS, TNF α , IFN-r + TNF α , IFN-r + LPS, o LPS + TNF α (todas a 100 ng/ml, excepto LPS a 1 μ g/ml) durante 18 horas (LYPD3) o 24 horas (LY6H o LYPD5). Se recogió y se purificó el ARN y se determinó la expresión del miembro indicado de la familia LY6 mediante la RT-PCR cuantitativa usando reactivos de Applied BiosystemsTM de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Los cebadores y las sondas usados para el análisis de la RT-PCR fueron los siguientes:

LYPD1:

5 Sentido directo: CAT GAT CCT CCG AAT CTG GT (SEQ ID NO: 59)
 Sentido contrario: AGC ACA GAA CAG AGG GGC TA (SEQ ID NO: 60)
 Sonda: ATA CGG CCA ATG TCA CAA CA (SEQ ID NO: 61)

LYPD3:

10 Sentido directo: ACT TCC TGT TCC CAC CAC TG (SEQ ID NO: 62)
 Sentido contrario: AGA GGA CAA GCG GAG AGA CA (SEQ ID NO: 63)
 Sonda: TTC TGG CAG GGG TGT TCT AG (SEQ ID NO: 64)

15 LY6H:

Sentido directo: AGC AGC AGC AGG AAG GAT (SEQ ID NO: 65)
 Sentido contrario: AAA AGT GCC GCT TAA CGA AG (SEQ ID NO: 66)
 Sonda: CAA GAT GTG TGC TTC CTC CTG CGA (SEQ ID NO: 67)

20 **[0298]** Los cebadores y sondas de LYPD5 se adquirieron de Applied Biosystems™ (número de catálogo HS00289062_ml).

25 **[0299]** Los resultados representados gráficamente en las Figuras 30A-30C indican las veces de aumento en la expresión de estos genes LY6 humanos con respecto a la B-actina humana del control. Se observaron aumentos significativos en la expresión de LY6H, LYPD3, y LYPD5 humanos tras el tratamiento con las citocinas indicadas.

Ejemplo 10. Expresión de genes LY6 humanos en el tejido de biopsia de colon

30 **[0300]** Para investigar adicionalmente la fuente de aumento de expresión de LYPD1 y LYOD5 en el colon de pacientes con CD y UC, se experimentó en una cohorte de biopsias de pacientes con UC, CD y controles. El análisis de la micromatriz de la expresión de LYPD1 usando ARN extraído de biopsias de colon mostró una expresión significativamente aumentada en tejido de colon inflamado de pacientes con CD (Figura 31A). En las biopsias de UC y CD tomadas del colon, se observó una expresión de LYPD5 significativamente aumentada en pacientes con UN y
 35 CD inflamadas (Figura 31B). Esto no se observó en las biopsias no inflamadas del control.

[0301] Se analizó la expresión de LY6H humano en biopsias de íleo terminal de tejido de IBD inflamado con respecto a biopsias de íleo terminal del control (sin IBD) usando el análisis de la RT-PCR (Taqman™). La expresión de LY6H humano fue al menos de 1,5 veces más en las biopsias de IBD inflamadas con respecto al control.

40 **[0302]** La expresión de LYPD3 humano en biopsias de colon de UC inflamadas estaba regulada en exceso y era menos de 2 veces mayor en biopsias de IBD inflamadas con respecto al control.

[0303] Los resultados de estos ejemplos demostraron la expresión de las moléculas de LY6 en la superficie de las IEC, y además indicaron que la expresión es única en las IEC en el contexto de la inflamación. Además, los niveles de expresión superficial de LY6A y LY6C fueron altos en las IEC de ratones colíticos, y casi universales a lo largo del colon. Para las moléculas, tanto las específicas del estado de enfermedad, como las ubicuamente expresadas durante la enfermedad, la detección del gen o del polipéptido de expresión de LY6 humano, particularmente LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5 humanos, es un procedimiento útil para detectar la IBD, incluyendo la UC y/o la CD en seres humanos. Adicionalmente, el procedimiento de detección de la expresión de LY6 humano es útil para el diagnóstico de la IBD, la UC y/o la CD en un ser humano y para vigilar la respuesta de la IBD a los agentes terapéuticos.

[0304] En los Ejemplos dados conocer en la presente memoria descriptiva, se demostró la significación funcional de la expresión de LY6 en las IEC. Las células YAMC fueron muy positivas para LY6A, y expresaron niveles inferiores de LY6C. Sin embargo, tras la estimulación con numerosas citocinas presentes en el interior del colon durante la colitis, incluyendo IL-1β, TNFα, IFNα, y en particular IL-22 e IFNγ, los niveles de expresión de ambas moléculas de LY6 se potenciaron mucho. Las células YAMC pretratadas con IFNγ para regular en exceso la expresión de las moléculas de LY6, fueron un útil modelo *in vitro* para analizar la significación funcional de la
 60 expresión de LY6

[0305] La naturaleza condicionalmente inmortalizada de las células YAMC se formula a partir de la expresión que impulsa el promotor MHCII del antígeno T grande de SV40; se usaron bajos niveles (2,5-5 U/ml) de IFNγ para impulsar la proliferación de estas células (Whitehead, R.H. y col. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90: 587-591; Whitehead, R.H., y J.L. Joseph. (1994) Epithelial Cell Biol 3: 119-125). Las células YAMC se usan a menudo como un modelo *in vitro* para los tratamientos de citocinas de las IEC de murino (Mei, J.M. y col. (2000) Faseb J 14: 1188-

1201; Yan, F., y D.B. Polk (2002) *J Biol Chem* 277: 50959-50965). El antígeno T grande de SV40 que contenían estas células es sensible a la temperatura, y no funcional a 37 °C. todos los experimentos llevados a cabo en la presente memoria descriptiva implicaron el tratamiento con IFN γ en estas condiciones no permisivas. Además las células YAMC se malnutrieron de suero (y no se les suministró IFN γ) a 37 °C durante 24 horas antes de los experimentos. En dichas condiciones, no se observaron los efectos que indicaban la expresión residual del antígeno T, tales como la proliferación de células. Como resultado, los efectos del tratamiento con IFN γ fueron debidos a los efectos inherentes de IFN γ más bien que a los efectos derivados de la impulsión de la expresión del antígeno T. Además, se detectó la regulación en exceso de los miembros de la familia LY6 en una segunda línea de células de murino, CMT93, confirmando que este efecto es ampliamente aplicable a las IEC.

10

[0306] Además, se señaló que tras el tratamiento con TNF α , IL-1 β e, IL-22, IFN γ no fue única entre las citocinas en la inducción de las moléculas de LY6 como una regulación modesta de la expresión de LY6. La regulación en exceso de las moléculas de LY6 en la IEC en respuesta a IL-22 es interesante a la luz de recientes datos que demuestra un potencial papel de IL-22 en la Enfermedad de Crohn (Wolk, K., y col. *J Immunol* 178: 5973-5981 (2007)). Aunque que la homología entre moléculas de LY6 de ratón y ser humano es a menudo complicada, existen evidencias que sugieren que la regulación en exceso de las moléculas de LY6 no está restringida a ratones. Estudios previos en ratas han sugerido la regulación en exceso de las moléculas de LY6 en el intestino delgado en modelos de colitis, y se ha sugerido que dicha expresión está implicada en la inflamación, las interacciones célula/célula así como la señalización en el interior de las IEC de rata (Baksheev, L. y col. *J Gastroenterol* 41: 1041-1052 (2006)).

20

[0307] Los datos descritos anteriormente indican que existe una posibilidad de que la integridad de la balsa lipídica esté implicada en la transducción de la señal mediada por LY6C en las IEC. Esto implica que la perturbación de las balsas lipídicas puede servir para atenuar los efectos en la dirección 3' de la estimulación de LY6C tanto regulando en defecto la expresión de LY6C como perturbando los componentes estructurales de la señalización de LY6C. Recientemente, se ha determinado que el agotamiento del colesterol de las IEC con estatinas inhibe la expresión proinflamatoria del gen a través de la modulación de NF- κ B (Lee, J. y col., *Int Immunopharmacol* 7: 241-248 (2007)). Además, las estatinas han sido eficaces agentes terapéuticos en los modelos de colitis en murino (Naito, Y., y col. *Int J Mol Med* 17: 997-1004 (2006)). El mecanismo que conecta la motilidad de la balsa lipídica y el bloqueo de NF- κ B permanece sin determinar, pero los datos de los inventores sugieren que la activación mediante LY6C podría ser una hipótesis que explicara el mecanismo de acción.

25

30

[0308] En este estudio, los inventores identificaron moléculas de LY6 como un interruptor potencial en la dirección 5' en la expresión de los genes de la quimiocina. La reticulación del receptor de LY6C con anticuerpos monoclonales dio como resultado una regulación en exceso drástica de casi todas las quimiocinas analizadas, incluyendo CXCL5. Los inventores confirmaron adicionalmente que la secreción de CXCL5 está muy potenciada en las IEC reticuladas de LY6C. Es interesante que incluso aunque LY6A y LY6C están anclados a la superficie celular por un resto GPI, y a pesar de los mayores niveles de expresión de LY6A que de LY6C sobre la superficie de las IEC, se observó que los efectos de la secreción de quimiocinas en la dirección 3' con la reticulación de LY6C no fueron consistentes con la reticulación de LY6A.

35

40

Ejemplo 11: Identificación de un ligando de LYPD5

[0309] En este estudio, se llevó a cabo una búsqueda de los ligandos de LYPD5 mediante las técnicas bien conocidas por las personas normalmente expertas en la materia, concretamente mediante la clonación de la expresión de aproximadamente 14.000 genes humanos en el promotor de CMV en células COS. Se transfectaron los combinados de 100 genes en las células COS que crecían en 140 pocillos en placas de 12 pocillos tras la transfección, las células se tiñeron con la proteína LYPD5-Fc (véase la Figura 32). Se identificaron los pocillos con la tinción positiva y se transfectaron los clones individuales en células COS. Se identificó un único pocillo que expresaba una única proteína, GLG-1 (ESL-1) como un ligando de LYPD5. GLG-1 se caracteriza por un dominio extracelular más largo (ECD), un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. Se llevaron a cabo una serie de estudios de inmunoprecipitación simultánea usando técnicas conocidas por las personas normalmente expertas en la materia para evaluar la capacidad de diversas regiones del GLG ECD de unirse a LYPD5. Se encontró que variantes o fragmentos del GLG ECD (véanse las Figuras 33-35) eran capaces de servir como ligando de LYPD5. La Figura 33B muestra los resultados de los estudios de inmunoprecipitación simultánea usando los Fragmentos 1, 2, 3, o 4 tal como se representa gráficamente en la Figura 33A y demuestran que uno cualquiera de los fragmentos es suficiente para la unión de LYPD5.

50

55

[0310] Adicionalmente, se encontró que un dominio GLG-1 ECD por sí mismo era suficiente para la unión de LYPD5. Tal como se muestra en la Figura 33, GLG-1 se elabora de múltiples dominios GLG-1 y dominios GLG-1 individuales se pueden unir a LYPD5. La Figura 34B muestra los resultados de una inmunoprecipitación simultánea que demuestran que los Fragmentos 1, 2, 3, y 4 así como los dominios GLG-1 individuales 115, 150, 215, 538, 609, 670, 729, y 858 (tal como se muestra en la Figura 34A) fueron capaces de unirse a LYPD5.

60

[0311] A través de otro estudio de inmunoprecipitación simultánea, se muestra que la unión es específica basándose en los fragmentos de LYPD5 (véase la Figura 35A) en los que se encontró que LYPD5 no se unía al control negativo de BAP, y se encontró que el control negativo FN-14 no se unía al fragmento 2 de GLG-1, el dominio 115 de GLG-1 humano se une a LYPD5, el dominio 115 no se expresa siempre a niveles detectables pero todavía hace bajar LYPD5, y la fracción del fragmento 1 de GLG-1 del dominio 115 (restos 26-114) no se une a LYPD5 (Figura 35B).

[0312] El “*” en las Figuras 34A y 35A indica un sitio de fucosilación potencial.

10 **[0313]** Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por medio de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben construirse como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0314]

- 5 <110> Diehl, Lauri;
Flanagan, Kenneth;
Mo, Lian;
Genentech Inc.,
- 10 <120> PROCEDIMIENTOS PARA DETECTAR LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO
<130> 39766-0296.PCT
<140> No se ha asignado todavía
<141> Adjunto
<150> US 60/891.196<151> 22-02-2007
- 15 <150> US 60/987.752<151> 13-11-2007
<150> US 61/024.170<151> 28-01-2008
<160> 69
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
- 20 <211> 957
<212> ADN
<213> Homo Sapiens
<400> 1

```

cgcgctctgcg gctgcgttcc ccgaaagacg aggctgcgcc cggattccgg tccgcagggga 60
gaccgaaggg cacagctccc cgcgccgcgc acgccgcccg agcccggagt gcggacaccc 120
ccgggatgct tgcgccccag aggaccgcgc cccaagccc cgcgccgcgc ccaggccca 180
cccggagcat gctgcctgca gccatgaagg gcctcggcct ggcgctgctg gccgtcctgc 240
tgtgctcggc gcccgctcat ggcctgtggt gccaggactg caccctgacc accaactcca 300
gccattgcac cccaagcag tgccagccgt ccgacacggt gtgtgccagt gtccgaatca 360
ccgatcccag cagcagcagg aaggatcact cggatgaaca gatgtgtgcc tcctcctgtg 420
acttcgttaa gcgacacttt ttctcagact atctgatggg gtttattaac tctgggatct 480
taaaggtcga cgtggactgc tgcgagaagg atttgtgcaa tggggcggca ggggcagggc 540
acagcccctg ggccctggcc ggggggctcc tgctcagcct ggggcctgcc ctccctctggg 600
ctgggcctg atgtctctc ctcccacgg ggcttctgag cttgctccc tgagcctgtg 660
gctgccctct cccagcctg gcgtggctgg ggctggggc agccttgcc cagctccgtg 720
gctgtggcct gtggctctca ctccctcccc gacgtgaagc ctccctgtct ctccgcccag 780
tctgagtccc aggcagctgg acatctccag gaaaccaggc catctgggca ggaggcctgg 840
ggatgagggt ggggggggac ccccaggctc cggaggggaa gtgaagcaac agcccagctg 900
gaagggcgtc ttctgcccag aaataaagtc acttttgagt cctgagaaaa aaaaaaa 957

```

- 25 <210> 2
<211> 140
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
- 30 <400> 2

ES 2 379 413 T3

```

Met Leu Pro Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val
1      5      10     15
Leu Leu Cys Ser Ala Pro Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr

                20                25                30
Leu Thr Thr Asn Ser Ser His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser
35      40      45
Asp Thr Val Cys Ala Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg
50      55      60
Lys Asp His Ser Val Asn Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val
65      70      75      80
Lys Arg His Phe Phe Ser Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly
85      90      95
Ile Leu Lys Val Asp Val Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly
100     105
Ala Ala Gly Ala Gly His Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu
115     120     125
Leu Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Trp Ala Gly Pro
130     135     140

```

- <210> 3
- <211> 2683
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 3

ES 2 379 413 T3

agggcgggtg	caatgcaccc	tccagcggtg	cgcgcaggcg	ggagaaggga	gggcggcccg	60
ggcaagtgag	acagttaagg	cagtgtcccc	accacacccc	cacccagatt	ggccacgcgc	120
agctggttct	tgacagaagg	ccttcgcgga	ggaagagggg	gcacagctgc	acaggacacc	180
ctacggagcc	tgcgggcgtg	gaactttgcc	aggcgcacgg	gaacgcgcgc	ccttcctgtc	240
agcctcccgg	ggcgccaggc	tcccgcggcc	cgcagcggga	cagcctcagt	tgtgtgggct	300
ggacccagtc	gctgggttac	cgaccagtc	tggaaaggcg	agaggacgtg	gagtggggag	360
gctgccttcc	tatgtgcgaa	gggccagccg	ggcacgcagt	cctcagaccc	tagtccgcac	420
ccggcaggtc	cccacggcac	ctgctgcgcc	ctcctgcgcg	ctccccaac	ctccccatct	480
cagaaaacta	ccagttctct	cccgcctccc	ggcgcccctt	tcccaggaac	gtgctggaggc	540
gggagaagag	gaagacagga	agggggtggg	gatgtgaagc	gaccgtccca	gccttccccg	600
cccgccaccc	ccaccccaac	tggcagcccg	tcacgtgatg	cctggagtgg	gaggtgggga	660
gaaaaggcga	gacttttggtg	ggtgctcccg	atcgccagta	gttccttcag	tctcagccgc	720
caactccgga	ggcgcggtgc	tggccccggg	agcgcgagcg	ggaggagcag	agacccgcag	780
ccgggagccc	gagcgcgggc	gatgcaggtc	ccgcgagcgg	cactgcggc	tcctctaagc	840
tacgaccgtc	gtctcccgcg	cagcagcgcg	ggccccagca	gcctcggcag	ccacagccgc	900
tgcagccggg	gcagcctccg	ctgctgtcgc	ctcctctgat	gcgcttgccc	tctcccggcc	960
ccgggactcc	gggagaatgt	gggtcctagg	catcgccgca	actttttgcg	gattgttctt	1020
gcttccaggc	tttgcgctgc	aaatccagtg	ctaccagtg	gaagaattcc	agctgaacaa	1080
cgactgtctc	tccccgagtg	tcattgtgaa	ttgcacggtg	aacgttcaag	acatgtgtca	1140
gaaagaagtg	atggagcaaa	gtgccgggat	catgtaccgc	aagtccctgtg	catcatcagc	1200
ggcctgtctc	atcgctctg	ccgggtacca	gtccttctgc	tccccagggg	aactgaactc	1260
agttttgatc	agctgctgca	acaccctct	ttgtaacggg	ccaaggccca	agaaaagggg	1320
aagttctgcc	tggccctca	ggccagggct	ccgcaccacc	atcctgttcc	tcaaattagc	1380
cctcttctgc	gcacactgct	gaagctgaag	gagatgccac	ccctcctgc	attgttcttc	1440
cagccctcgc	ccccaacccc	ccacctcct	gagtgaagtt	cttctgggtg	tccttttatt	1500
ctgggtaggg	agcgggagtc	cgtgttctct	tttgttctg	tgcaataat	gaaagagctc	1560
ggtaaagcat	tctgaataaa	ttcagcctga	ctgaattttc	agtatgtact	tgaaggaagg	1620
aggtggagtg	aaagttcacc	cccatgtctg	tgtaaccgga	gtcaaggcca	ggctggcaga	1680
gtcagtcctt	agaagtcact	gaggtgggca	tctgcctttt	gtaaagcctc	cagtgtccat	1740
tccatccctg	atgggggcat	agtttgagac	tgcagagtga	gagtgcggtt	ttcttagggc	1800
tggagggcca	gttcccactc	aaggctcct	cgcttgacat	tcaaacttca	tgctcctgaa	1860
aaccattctc	tgcagcagaa	ttggctggtt	tgcgcctga	gttgggctct	agtgactcga	1920
gactcaatga	ctgggactta	gactggggct	cggcctcgct	ctgaaaagtg	cttaagaaaa	1980
tcttctcagt	tctccttgca	gaggactggc	gccgggacgc	gaagagcaac	gggcgctgca	2040
caaagcgggc	gctgtcggtg	gtggagtgcg	catgtacgcg	caggcgcttc	tcgtgggttg	2100
cgtgctgcag	cgacagcgcg	cagcacagca	cctgcacgaa	cacccgccga	aactgctgcg	2160
aggacaccgt	gtacaggagc	gggttgatga	ccgagctgag	gtagaaaaac	gtctccgaga	2220
aggggaggag	gatcatgtac	gccccgaagt	aggacctcgt	ccagtcgtgc	ttgggtttgg	2280
ccgcagccat	gatcctccga	atctggttgg	gcatccagca	tacggccaat	gtcacaacaa	2340
tcagccctgg	gcagacacga	gcaggaggga	gagacagaga	aaagaaaaac	acagcatgag	2400
aacacagtaa	atgaataaaa	ccataaaata	tttagccct	ctgttctgtg	cttactggcc	2460
aggaaatggt	accaattttt	cagtgttggg	cttgacagct	tcttttgcca	caagcaagag	2520
agaatttaac	actgtttcaa	acccggggga	gttggctgtg	ttaaagaaa	accattaat	2580
gctttagaca	gtgtatttat	accagttgat	gtctgttaat	tttaaaaaaa	tgttttcatt	2640
ggtggtttgtt	tgcgtatcca	gaaagcagtt	catgttatcc	ata		2683

<210> 4

<211> 1959

5 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 4

ES 2 379 413 T3

```

gatgcctgga gtgggaggtg gggagaaaag gcgagacttt tgtgggtgct cccgatcgcc 60
agtagttcct tcagtctcag ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcggcc cgggagcgcg 120
agcgggagga gcagagaccg gcagccggga gcccgagcgc gggcgatgca ggctccgca 180
gcggcacctg cggctcctct aagctacgac cgctcgtctcc gcggcagcag cgcgggcccc 240
agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgcctctc 300
tgatgcgctt gccctctccc ggccccggga ctccgggaga atgtgggtcc taggcatcgc 360
ggcaactttt tgcggattgt tcttgcttcc aggttttgcg ctgcaaatac agtgctacca 420
gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctcctccc gagttcattg tgaattgcac 480
ggtgaacggt caagacatgt gtcagaaaaga agtgatggag caaagtgccg ggatcatgta 540
ccgcaagtcc tgtgcatcat cagcggcctg tctcatcgcc tctgccgggt accagtcctt 600
ctgctcccca gggaaactga actcagtttg catcagctgc tgcaacaccc ctctttgtaa 660
cgggccaagg cccaagaaaa ggggaagttc tgcctcggcc ctcaaggccag ggctccgcac 720
caccatcctg ttctcaaat tagcctctt ctccggcacac tgctgaagct gaaggagatg 780
ccacccccct ctgcattggt cttccagccc tcgcccccaa cccccacct ccctgagtga 840
gtttctctcg ggtgtccttt tattctgggt agggagcggg agtccgtggt ctcttttgtt 900
cctgtgcaaa taatgaaga gctcggtaaa gcattctgaa taaattcagc ctgactgaat 960
tttcagtatg tacttgaagg aaggaggtgg agtgaaagt caccacctatg tctgtgtaac 1020
cggagtcaag gccaggctgg cagagtcagt ccttagaagt cactgaggtg ggcactctgc 1080
ttttgtaaaag cctccagtgt ccattccatc cctgatgggg gcatagtttg agactgcaga 1140
gtgagagtga cgttttctta gggctggagg gccagttccc actcaaggct ccctcgcttg 1200
acattcaaac ttcattgctc tgaaaacat tctctgcagc agaattggct ggtttcgcg 1260
ctgagttggg ctctagtgc tgcagactca atgactggga cttagactgg ggctcggcct 1320
cgtctgaaa agtgcttaag aaaatcttct cagttctcct tgcagaggac tggcggccgg 1380
acgcgaagag caacgggcgc tgcacaaagc gggcgctgtc ggtggtggag tgcgatgta 1440
cgcgcagcg cttctcgtgg ttggcgtgct gcagcgacag gcggcagcac agcacctgca 1500
cgaacacccg ccgaaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag gagcgggttg atgaccgagc 1560
tgaggtagaa aaacgtctcc gagaagggga ggaggatcat gtacgcccgg aagtaggacc 1620
tcgtccagtc gtgcttgggt ttggccgcag ccatgatcct ccgaatctgg ttgggcatcc 1680
agcatacggc caatgtcaca acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca 1740
gagaaaaaaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat aaaaccataa aatatttagc 1800
ccctctgttc tgtgcttact ggccaggaaa tggtagcaat ttttcagtgt tggacttgac 1860
agcttctttt gccacaagca agagagaatt taacactggt tcaaaccggg gggagtggc 1920
tgtgttaaaag aaagaccatt aatgcttta gacagtgta 1959

```

- <210> 5
- <211> 141
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 5

```

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Leu Leu
 1          5          10          15
Pro Gly Phe Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu Phe Gln
 20          25          30
Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn Cys Thr Val
 35          40          45
Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu Gln Ser Ala Gly

      50          55          60
Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala Ala Cys Leu Ile Ala
65          70          75          80
Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val
      85          90          95
Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys
100          105          110
Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Leu Arg Pro Gly Leu Arg Thr Thr
115          120          125
Ile Leu Phe Leu Lys Leu Ala Leu Phe Ser Ala His Cys
130          135          140

```

10

- <210> 6
- <211> 1745
- <212> ADN
- 15 <213> Homo Sapiens
- <400> 6

ES 2 379 413 T3

```

aaggtgggg ttgctgggg cgaggttact catcctgggc tcaggtaga gggcccgagc 60
tcggaggcgg cacatccagg ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc 120
aggaaagcag gtgcccaggc catgatctgg actgcaggct ggctgtgctt gctgctgctt 180
cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtac agctgcgtgc agaaagcaga tgacggatgc 240
tccccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgcccggcg tggacgtctg caccgaggcc 300
gtggggggcg tggagaccat ccacggacaa ttctcgtctg cagtgcgggg ttgctggttcg 360
ggactccccg gcaagaatga ccgcgccctg gatcttcacg ggcttctggc gttcatccag 420
ctgcagcaat gcgctcagga tcgctgcaac gccaaactca acctcacctc gcgggcgctc 480
gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgtca cagctgtgtg 540
ggctgagcc gggaggcgtg ccagggtaca tcgcccggcg tcgtgagctg ctacaacgcc 600
agcgtatcat tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca ccttgacggc agctaattgtg 660
actgtgtcct tgctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgactcgc ggatggagta 720
acaggcccag ggttcacgct cagtggctcc tgttgccagg ggtcccgtg taactctgac 780
ctccgcaaca agacctactt ctcccctcga atcccacccc ttgtccggct gccccctcca 840
gagcccacga ctgtggcctc aaccacatct gtcaccactt ctacctcggc cccagtgaga 900
cccacatcca ccaccaaacc catgccagcg ccaaccagtc agactccgag acagggagta 960
gaacacgagg cctcccggga tgaggagccc aggttgactg gaggcggcgc tggccaccag 1020
gaccgcagca attcagggca gtatcctgca aaaggggggc cccagcagcc ccataataaa 1080
ggctgtgtgg ctcccacagc tggattggca gcccttctgt tggccgtggc tgctggtgtc 1140
ctactgtgag cttctccacc tggaaatttc cctctcacct acttctctgg ccctgggtac 1200
ccctcttctc atcaattcct gtcccacca ctggactggg ctggcccagc ccctgttttt 1260
ccaacattcc ccagtatccc cagcttctgc tgcgctggtt tgcggctttg ggaaataaaa 1320
taccgttgta tatattctgc caggggtgtt ctagcttttt gaggacagct cctgtatcct 1380
tctcatcctt gtctctccgc ttgtcctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag 1440
ctgtcacggg gaagggtgaga gagaggatgc taagcttcct actcactttc tctagccag 1500
cctggacttt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctcc ccactctaag cactgcctcc 1560
cctactcccc gcatctttgg ggaatcgggt ccccatatgt cttccttact agactgtgag 1620
ctcctcgagg gcagggaccg tgccttatgt ctgtgtgtga tcagtttctg gcacataaat 1680
gcctcaataa agatttaatt actttgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaa

```

- <210> 7
- 5 <211> 346
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 7

ES 2 379 413 T3

```

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

          35          40          45
Met Lys Thr Val Lys Cys Ala Pro Gly Val Asp Val Cys Thr Glu Ala
50      55      60
Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Arg
65      70      75      80
Gly Cys Gly Ser Gly Leu Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu Asp Leu
85      90      95
His Gly Leu Leu Ala Phe Ile Gln Leu Gln Gln Cys Ala Gln Asp Arg
100     105     110
Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Ser Arg Ala Leu Asp Pro Ala Gly
115     120     125
Asn Glu Ser Ala Tyr Pro Pro Asn Gly Val Glu Cys Tyr Ser Cys Val
130     135     140
Gly Leu Ser Arg Glu Ala Cys Gln Gly Thr Ser Pro Pro Val Val Ser
145     150     155     160
Cys Tyr Asn Ala Ser Asp His Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp Gly Asn
165     170     175
Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val Arg Gly
180     185     190
Cys Val Gln Asp Glu Phe Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly Pro Gly
195     200     205
Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Ser Arg Cys Asn Ser Asp
210     215     220
Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu Val Arg
225     230     235     240
Leu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Thr Val Ala Ser Thr Thr Ser Val Thr
245     250     255
Thr Ser Thr Ser Ala' Pro Val Arg Pro Thr Ser Thr Thr Lys Pro Met
260     265     270
Pro Ala Pro Thr Ser Gln Thr Pro Arg Gln Gly Val Glu His Glu Ala
275     280     285
Ser Arg Asp Glu Glu Pro Arg Leu Thr Gly Gly Ala Ala Gly His Gln
290     295     300
Asp Arg Ser Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Pro Gln Gln
305     310     315     320
Pro His Asn Lys Gly Cys Val Ala Pro Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu
325     330     335
Leu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val Leu Leu
340     345

```

- <210> 8
- <211> 2490
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 8

ES 2 379 413 T3

gatccgcttt ggcgatccca gtgattcttg ggttccgctt gtagtttcgg aaggagacat 60
 cgaagcagg cgaggcgag agggcggtgc ggactcatgc cccagtcggc agtgcggggt 120
 cccaagccct gcagtgtac agctttgagc acacctactt tggccccttt gacctcaggg 180
 ccatgaagct gccagcatc tcctgtcctc atgagtgtt tgaggctatc ctgtctctgg 240
 acaccgggta tcgcgcccg gtgaccctgg tgcggaaggg ctgctggacc gggcctcctg 300
 cgggcccagac gcaatcgaac gcggacgcgc tgcccagaga ctactcgggt gtgcgcggt 360
 gcacaactga caaatgcaac gccacctca tgactcatga cgccctcccc aacctgagcc 420
 aagcaccga cccgccgag ctcagcggcg ccgagtgtta cgctgtatc ggggtccacc 480
 aggatgactg cgctatcggc aggtcccagc gagtccagtg tcaccaggac cagaccgct 540
 gcttccagg caatggcaga atgacagttg gcaatttctc agtccctgtg tacatcagaa 600
 cctgccaccg gccctcctgc accaccgagg gcaccaccag ccctggaca gccatcgacc 660
 tccagggtc ctgctgtgag gggtagctct gcaacaggaa atccatgacc cagccctca 720
 ccagtgttc agccaccacc cctcccagag cactacaggt cctggcctg ctctcccag 780
 tcctcctgtc ggtggggctc tcagcataga ccgcccctcc aggatgctgg ggacagggct 840

cacacacctc attcttgctg cttcagcccc tatcacatag ctactggaa aatgatgta 900
 aagtaagaat tgactcctg tccctctggc cttccatctc tcccgcctt gtgccccaca 960
 acctggccaa cagtactgga agaaactgga cacagtcacc agcatccccg gggagggcaa 1020
 aacagccatg tcgtgccccg atgaagagca attctgatca cagctgttac tactgagca 1080
 ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttctgtg ctctccctcc agagcctgtc 1140
 gcagctctag gaggagcta tacaatgatg tctttattag tgcctcatg agaagcccaa 1200
 taagcagtat gccctaacag ttagtaggcc aggtctgtga gctaagctgc atgggttaa 1260
 atcccagctc caccattcag cctgcagaga ccatgagcga gttacttaag ccaggtctg 1320
 gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tcagcattc agcctacaga gaccatgggt 1380
 gagttactta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaatccca gctccaccat 1440
 tcagcctgca gagactgtgg gtgagttact tgagctctct gtgccaatat tttctcact 1500
 ataaggtgga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga actactcac agtagttgca 1560
 gtgaggattc aacgagatga acatthagta cttgggacac agcagtggcc cagtgtaaat 1620
 gggctacttg tcataagccc taagtcacag gtcaacaac tgagaggcaa aagcacttg 1680
 ttgagcttgt gtatctagtg agtatggatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg 1740
 ctaagcaacc ccacctcta aacacatgag tgccgattaa cttcacagaa aaacacacaa 1800
 ggcaaaagt c agcaggtga aattctccaa gctataaaga tcagggaaga cttcctggag 1860
 gaattcacc ttgagcaaaa tcctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag 1920
 gaagcgatt ctaggtagag gagacagcct ggacaaaggt ctgaggagg aaggagcaca 1980
 aggagtgcag gacacttca tgagtgcagg acactttcat aactgcatga acttcataga 2040
 gatgggatcc tttagcatgt tctctgtgca catgcttgac catgttctt cacatgctt 2100
 ttgccacttg atctttccag caactcagtg agagaagcaa aaaagtaagt tgcctcctg 2160
 tattgtctga atgtttgtgt ctccccaaaa ttcatctttt gaaacctaat taccaaagt 2220
 atattactgg gaggtggggc ctttgggagg tggtagatc atgagggtgg agccccatg 2280
 aataggatta gtgcccttat aaaagaggcc ctggagagct gccttgcccc ttccaccaca 2340
 tgagaacaca gccagcaggt gcctataagc aagaaagtgg gttctacca gccatcgaat 2400
 ctgctggtgc attgattgca gacttcccag actccagagc tatgagacat aaatttctgt 2460
 tgtgtataag ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2490

- <210> 9
- <211> 2118
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 9

ES 2 379 413 T3

gattcttggg ttccgcgct agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag 60
ggcgttgccg actcatgccc cagtcggcag tgcgggggtcc caagccctgc agtgctacag 120
ctttgagcac acctactttg gccctttga cctcagggcc atgaagctgc ccagcatctc 180
ctgtcctcat gagtgtttg aggctatcct gtctctggac accgggtatc gcgcgccggt 240
gaccctggtg cggaaaggct gctggaccgg gcctcctgcg ggccagacgc aatcgaaccc 300
ggacgcgctg ccgccagact actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc 360
ccacctcatg actcatgacg ccctcccaa cctgagccaa gcacccgacc cgccgacgct 420
cagcggcgcc gagtgtacg cctgtatcgg ggtccaccag gatgactgcg ctatcggcag 480
gtcccgcgca gtccagtgtc accaggacca gaccgcctgc ttccagggca gtggcagaat 540
gacagttggc aatttctcag tccctgtgta catcagaacc tgccaccggc cctcctgcac 600
caccgagggc accaccagcc cctggacagc catcgacctc cagggctcct gctgtgaggg 660
gtacctctgc aacaggaaat ccatgaccca gcccttcacc agtgcttcag ccaccacccc 720
tccccgagca ctacaggtcc tggccctgct cctcccagtc ctctgtctgg tggggctctc 780
agcatagacc gccctccag gatgctgggg acagggctca cacacctcat tcttgtctg 840
tcagccccta tcacatagct cactggaaaa tgatgttaaa gtaagaattg cactcctgtc 900
cctctggcct tccatctctc ctgcccttgt gccccacaac ctggccaaca gtactggaag 960
aaactggaca cagtaccag catcccaggg gagggcaaaa cagccatgct gtgcctgat 1020
gaagagcaat tctgatcaca gctgttactc actgagcacc agccaggcac caggcacccc 1080
ataacacggc ttctgtgct ctcttccag agcctgtcgc agctctaggg gggagctata 1140
caatgatgtc tttattagt tcatcatgag aagcccaata agcagtatgc cctaacagtt 1200
agtaggccag gctctggagc taagctgcat gggttcacat cccagctcca ccattcagcc 1260
tgcagagacc atgagcgagt tacttaagcc aggctctgga gctaagctgc atgggttaa 1320
atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga gttacttaag ccaggctctg 1380
gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt 1440
gagttacttg agctctctgt gccaatatct tctcacctat aaggtggagg tgaaaataaa 1500
ctctataaca tgacaagaac tacttcacag tagttgcagt gaggattcaa cgagatgaac 1560

athtagtact tgggacacag cagtggccca gtataaatgg gctacttgtc ataagcccta 1620
agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttggtt gagcttgtgt atctagttag 1680
tatggattca gggaccagat tcccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctcctaaa 1740
cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa acacacaagg caaagttcag cgaggtgaaa 1800
ttctccaagc tataaagatc agggaagact tcctggagga attcaccctt gagcaaaatc 1860
ctaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacatctt aggtagagga 1920
gacagcctgg acaaaggctt gagggaggaa ggaacacaag gagtgcagga cactttcata 1980
actgcatgaa cttcatagag atgggatcct ttagcatggt ctctgtgcac atgcttgacc 2040
atgttctttc acatgctttt tgccacttga tctttccagc aactcagtga gagaagcaaa 2100
aaagtaagtt gcatcctg

- <210> 10
- <211> 208
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 10

ES 2 379 413 T3

Met	Lys	Leu	Pro	Ser	Ile	Ser	Cys	Pro	His	Glu	Cys	Phe	Glu	Ala	Ile
1				5					10					15	
Leu	Ser	Leu	Asp	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ala	Pro	Val	Thr	Leu	Val	Arg	Lys
			20					25					30		
Gly	Cys	Trp	Thr	Gly	Pro	Pro	Ala	Gly	Gln	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Asp
		35					40					45			
Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Arg	Gly	Cys	Thr	Thr	Asp	Lys
	50					55					60				
Cys	Asn	Ala	His	Leu	Met	Thr	His	Asp	Ala	Leu	Pro	Asn	Leu	Ser	Gln
65					70					75					80
Ala	Pro	Asp	Pro	Pro	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Glu	Cys	Tyr	Ala	Cys	Ile
				85					90					95	
Gly	Val	His	Gln	Asp	Asp	Cys	Ala	Ile	Gly	Arg	Ser	Arg	Arg	Val	Gln
			100					105						110	
Cys	His	Gln	Asp	Gln	Thr	Ala	Cys	Phe	Gln	Gly	Asn	Gly	Arg	Met	Thr
		115					120					125			
Val	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	Pro	Val	Tyr	Ile	Arg	Thr	Cys	His	Arg	Pro
	130					135					140				
Ser	Cys	Thr	Thr	Glu	Gly	Thr	Thr	Ser	Pro	Trp	Thr	Ala	Ile	Asp	Leu
145					150					155					160
Gln	Gly	Ser	Cys	Cys	Glu	Gly	Tyr	Leu	Cys	Asn	Arg	Lys	Ser	Met	Thr
				165					170					175	
Gln	Pro	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Thr	Pro	Pro	Arg	Ala	Leu	Gln
			180					185					190		
Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Ser	Ala
		195					200						205		

<210> 11
 <211> 806
 5 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11

```

gccaccccc gccagcccg tgcctataag gccttgcaa tgcaggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
tgtggtctgc ccggccagct ctcgcttctg caagaccagc aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca cccagctaca cctgcaagg 300
ccaggtcagc agcggcacca gctccaccca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa 360
gctgcacaac gctgcaccca cccgcaccgc cctcgccac agtgccctca gcctggggct 420
ggccctgagc ctcttgccg tcattcttag cccagcctg tgaccttccc cccagggag 480
gccctcatg ccttctctc ccttctctg gggattccac acctctctc cccagccgca 540
acgggggtgc caggagcccc aggctgaggg cttccccgaa agtctgggac caggtccagg 600
  
```

```

tgggcatgga atgctgatga cttggagcag gccccacaga cccacagag gatgaagcca 660
ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
cccggatttc acactccttc tgttttggtg ccgtttattt ttgtactcaa atctctacat 780
ggagataaat gatttaaacc agaaaa
  
```

10
 <210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 12

ES 2 379 413 T3

Met	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Cys	His	Val	Cys	Thr	Ser	Ser	Ser	Asn	Cys
			20					25						30	
Lys	His	Ser	Val	Val	Cys	Pro	Ala	Ser	Ser	Arg	Phe	Cys	Lys	Thr	Thr
		35					40					45			
Asn	Thr	Val	Glu	Pro	Leu	Arg	Gly	Asn	Leu	Val	Lys	Lys	Asp	Cys	Ala
50						55					60				
Glu	Ser	Cys	Thr	Pro	Ser	Tyr	Thr	Leu	Gln	Gly	Gln	Val	Ser	Ser	Gly
65					70					75					80
Thr	Ser	Ser	Thr	Gln	Cys	Cys	Gln	Glu	Asp	Leu	Cys	Asn	Glu	Lys	Leu
				85					90					95	
His	Asn	Ala	Ala	Pro	Thr	Arg	Thr	Ala	Leu	Ala	His	Ser	Ala	Leu	Ser
			100					105					110		
Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Ala	Pro	Ser	Leu
			115				120						125		

<210> 13
 <211> 1145
 5 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 13

```

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt 60
acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgctttggtt tgtgacctcc aggcaggacg 120
gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtgctc tggctgccct tctgggtgtg 180
gagcgagcca gctcgctgat gtgcttctcc tgcttgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
ctgaagccga ccatctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc 300
ggcattggga atctcgtgac atttggccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc 360
cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgtg gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
tttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
gccgggctgc tgctgagcct gctgccggcc ctgctgcggt ttggcccctg accgcccaga 540
ccctgtcccc cgatccccca gctcaggaag gaaagcccag cccttctggt atcccacagt 600
gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgctc gatctgtgcc cttgggtcca ggtcaggccc 660
accccctgca cctccacctg ccccagcccc tgctctgccc caagtgggcc agctgccctc 720
acttctgggg tggatgatgt gaccttcctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct 780
ggagtcttac ggtccaacat cagaccaagt cccatggaca tgctgacagg gtccccaggg 840
agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggagggagg tgtgccagca gcctggagag 960
cctcagtccc tgtagcccc tgccctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg 1020
ggggttgggg tttctgccac ttccgggtct aggccctgcc caaatccagc cagtctgcc 1080
ccagcccacc cccacattgg agccctctct ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
tcccc                                     1145
    
```

10
 <210> 14
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 14

ES 2 379 413 T3

```

Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu
 1      5      10      15
Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn
 20      25      30
Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys
 35      40      45
Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly
 50      55      60
His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly
 65      70      75      80
Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe
 85      90      95
Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr
 100      105      110
Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg
 115      120      125
Phe Gly Pro
 130

```

- <210> 15
- <211> 550
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 15

```

ccagtctgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga 60
gcacagagga gtgggccggg accatgctgg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctggtgc 120
tggctgcctg cggagagctg gcgcccggcc tgcgctgcta cgtctgtccg gagcccacag 180
gagtgtcggg ctgtgtcacc atcgccacct gcaccaccaa cgaaaccatg tgcaagacca 240
cactctactc cggggagata gtgtaccctt tccaggggga ctccacgggtg accaagtctt 300
gtgccagcaa gtgtaagccc tcggatgtgg atggcatcgg ccagaccctg cccgtgtcct 360
gctgcaatac tgagctgtgc aatgtagacg gggcgcccgc tctgaacagc ctccactgct 420
gggcctcac gctcctccca ctcttgagc tccgactgta gagtccccgc ccacccccat 480
ggcctatgc ggcccagccc cgaatgcctt gaagaagtgc ccctgcacc agggaaaaaa 540
aaaaaaaaa 550

```

- 10
- <210> 16
- <211> 125
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- 15 <400> 16

```

Met Arg Gly Thr Arg Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Cys
 1      5      10      15
Gly Glu Leu Ala Pro Ala Leu Arg Cys Tyr Val Cys Pro Glu Pro Thr
 20      25      30
Gly Val Ser Asp Cys Val Thr Ile Ala Thr Cys Thr Thr Asn Glu Thr
 35      40      45
Met Cys Lys Thr Thr Leu Tyr Ser Arg Glu Ile Val Tyr Pro Phe Gln
 50      55      60
Gly Asp Ser Thr Val Thr Lys Ser Cys Ala Ser Lys Cys Lys Pro Ser
 65      70      75      80
Asp Val Asp Gly Ile Gly Gln Thr Leu Pro Val Ser Cys Cys Asn Thr
 85      90      95
Glu Leu Cys Asn Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Asn Ser Leu His Cys
 100      105      110
Gly Ala Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Arg Leu
 115      120      125

```

- <210> 17
- 20 <211> 3901
- <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 17

```

aagatggcgg cgtgtggagc tgtacggagg atgttccgct tgtcggcggc gctgcatctg 60
ctgctgctat tcgcggccgg ggccgagaaa ctccccggcc atggcgtcca cagccagggc 120
caggggtccc gggccaactt tgtgtccttc gtagggcagg ccggaggcgg cggccccggc 180
ggtcagcagc tgccccagct gcttcagtea tcgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag 240
caacagcaac agcagcttca gccgccgag ccgcctttcc cggcgggttg gcctccggcc 300
cggcggggag gagcgggggc tgggtggggc tggaagctgg cggaggaaga gtccctgcag 360
gaggacgtga ccgcggtgtg ccctaagcac acctggagca acaacctggc ggtgctcgag 420
tgcctgcagg atgtgagggg gcctgaaaat gaaatttctt cagactgcaa tcatttgttg 480
tggaattata agctgaacct aactacagat cccaaatttg aatctgtggc cagagaggtt 540
tgcaaatcta ctataacaga gattaaagaa tgtgctgatg aaccggtttg aaaaggttac 600
atggtttcct gcttagtgga tcaccgaggc aacatcactg agtatcagtg tcaccagtac 660
attaccaaga tgacggccat ctttttagt gattaccgtt taatctgtgg ctctatggat 720
gactgcaaaa atgacatcaa cattctgaaa tgtggcagta ttcggcttgg agaaaaggat 780
gcacattcac aaggtgaggt ggtatcatgc ttggagaaag gcctggtgaa agaagcagaa 840
gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctcaaga aagccattct ccgggtggct 900
gagctgtcat cggatgactt tcacttagac cggcatttat attttgctg ccgagatgat 960
cgggagcgtt ttgtgaaaa tacacaagct ggtgagggca gagtgtataa gtgcctcttt 1020
aaccataaat ttgaagaatc catgagttaa aagtgtcgag aagcacttac aaccgcccaa 1080
aagctgattg cccaggatta taaagtcagt tattcattgg ccaaactctg taaaagtjac 1140
ttgaagaaat accggtgcaa tgtggaaaac ctcccgcat cgctgaaagc caggctctcc 1200
tacttgttaa tgtgcctgga gtcagctgta cacagagggc gacaagtcag cagtgatgctg 1260
cagggggaga tgcctgatta ccgacgcatg ttgatggaag acttttctct gagccctgag 1320
atcatcctaa gctgtcgggg ggagattgaa caccattggt ccggattaca tcgaaaaggg 1380
cggaccctac actgtctgat gaaagtagtt cgaggggaga aggggaacct tggaatgaa 1440
tgccagcagg cgcttcaaac actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgcat 1500
gatcgagctt tgaatgaagc ttgtgaaact gtaatccaga cagcctgcaa acatataaga 1560
tctggagacc caatgatctt gtcgtgcctg atggaacatt tatacacaga gaagatgta 1620
gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtatttca tctccggga ttggaagctg 1680
gaccctgtcc tgtaccgcaa gtgccaggga gacgcttctc gtctttgcca caccacggg 1740
tggaatgaga ccagtgaatt tatgcctcag ggagctgtgt tctctgttt atacagacac 1800
gcctaccgca ctgaggaaca gggaggagg ctctcacggg agtgccgagc tgaagtccaa 1860
aggatcctac accagcgtgc catggatgtc aagctggatc atgacagaga ggataagtc 1920
ctgattgatc tgggaaaatg gtgcagtgag aaaacagaga ctggacagga gctggagtgc 1980
cttcaggacc atctggatga ctgggtggtg gagtgtagag atatagttgg caacctcact 2040
gagttagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttgctga tgagagcctg tgagcccata 2100
attcagaact ctgcccacga tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag 2160
tgtctgatac agaacaaaca ccagaaggac atgaaacgaga agtgtgccat cgggttacc 2220
cacttcagc tggtcagat gaaggatttt cggtttctt acaagtttaa aatggcctgc 2280
aaggaggacg tgtgaagct ttgccc aaac ataaaaaga aggtggacgt ggtgatctgc 2340
ctgagcacga ccgtgcgcaa tgacactctg caggaaagcca aggagcacag ggtgtccctg 2400
aagtgccgca ggcagctccg tgtggaggag ctggagatga cggaggacat ccgcttgag 2460
ccagatctat acgaagcctg caagatgac atcaaaaact tctgttccgc tgtgtaata 2520
ggcaacgctc agattatcga atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag caccgctgc 2580
caccaaaaag tatttaagct gcaggagaca gagatgatgg acccagagct agactacacc 2640
ctcatgaggg tctgcaagca gatgataaaag aggttctgtc cggaaagcaga ttctaaaacc 2700
atgttgacgt gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatcccaa atgcaaacag 2760
atgataacca agcgcagat caccagaac acagattacc gcttaaacc catgtaaga 2820
aaagcctgta aagctgacat tcctaaattc tgtcacggtg tctgactaa ggccaaggat 2880
gattcagaat tagaaggaca agtcatctct tgccctgagc tgagatatgc tgaccagcgc 2940
ctgtcttcag actgtgaaga ccagatccga atcattatcc aggagtcgcg cctggactac 3000
cgcctggatc ctgagctcca gctgactgac tcagacgaga tctccagctc atgtgtgaa 3060
gaagcagcag ccaagagca gacaggtcag gtggaggagt gcctcaagg caacctgctc 3120
aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa tggctaaaca tgctgaagga aagcaagca 3180
gacatcttgg ttgaccgggt acttcatact gcttgtgccc tggacattaa acaccactgc 3240

gcagccatca cccctggccg cgggctgcaa atgtcctgtc tcatggaagc actggaggat 3300
aagcgggtga ggttacagcc cgagtgcaaa aagcgcctca atgaccggat tgagatgtgg 3360
agttacgcag caaaggtggc cccagcagat ggcttctctg atcttgccat gcaagtaatg 3420
acgtctccat ctaagaacta cattctctct gtgatcagtg ggagcatctg tatattgttc 3480
ctgattggcc tgatgtgtgg acggatcacc aagcagatga cacgagagct caaggacag 3540
tagagccacc ttgaccacca aaggaactac ctatccagtg cccagttgt acagccctct 3600
tgtatgcgat ccccactcac ctgcctcttc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc 3660
attagcagat gtccactgcg ttgtcccac cagcctccac tcgtgtccat ggtgtcctcc 3720
tctcctcac cgtgcagcag cagcagctgg tcgctggggg tactgccttt gtttgcaaa 3780
cttgggttta cctgcctgta gacaagtctc tctcatacca acagaacttc cgttacttcc 3840
agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggctttttta agaaaaccac caaaaaaaaa 3900
a 3901

```

ES 2 379 413 T3

<210> 18
 <211> 1179
 <212> PRT
 5 <213> Homo Sapiens
 <400> 18

```

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala
 1      5      10      15
Leu His Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly
      20      25      30
His Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser
      35      40      45
Phe Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Pro Ala Gly Gln Gln Leu Pro
      50      55      60
Gln Leu Leu Gln Ser Ser Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
      65      70      75      80
Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Pro Gln Pro Pro Phe Pro Ala Gly Gly
      85      90      95
Pro Pro Ala Arg Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Trp Lys Leu
      100      105      110
Ala Glu Glu Glu Ser Cys Arg Glu Asp Val Thr Arg Val Cys Pro Lys
      115      120      125
His Thr Trp Ser Asn Asn Leu Ala Val Leu Glu Cys Leu Gln Asp Val
      130      135      140
Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp
      145      150      155      160
Asn Tyr Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala
      165      170      175
Arg Glu Val Cys Lys Ser Thr Ile Thr Glu Ile Lys Glu Cys Ala Asp
      180      185      190
Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser Cys Leu Val Asp His Arg
      195      200      205
Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys Met Thr
      210      215      220
Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp
      225      230      235      240
Cys Lys Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly
      245      250      255
Glu Lys Asp Ala His Ser Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys
      260      265      270
Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu Pro Lys Ile Gln Val Ser
      275      280      285
Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser Ser Asp
      290      295      300
Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg
      305      310      315      320
Glu Arg Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys
      325      330      335
    
```

ES 2 379 413 T3

Cys Leu Phe Asn His Lys Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg
 340 345 350
 Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile Ala Gln Asp Tyr Lys Val
 355 360
 Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys Tyr Arg
 370 375 380
 Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr
 385 390 395
 Leu Leu Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser
 405 410 415
 Ser Glu Cys Gln Gly Glu Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu
 420 425 430
 Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu Ser Cys Arg Gly Glu Ile
 435 440 445
 Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu His Cys
 450 455 460
 Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys
 465 470 475 480
 Gln Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp
 485 490 495
 Tyr Arg Ile Asp Arg Ala Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln
 500 505 510
 Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp Pro Met Ile Leu Ser Cys
 515 520 525
 Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys Glu His
 530 535 540
 Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp
 545 550 555 560
 Pro Val Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His
 565 570 575
 Thr His Gly Trp Asn Glu Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val
 580 585 590
 Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg Thr Glu Glu Gln Gly Arg
 595 600 605
 Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu His Gln
 610 615 620
 Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys Leu
 625 630 635 640
 Ile Asp Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Glu
 645 650 655
 Leu Glu Cys Leu Gln Asp His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg
 660 665 670
 Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr Glu Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln Ile
 675 680 685
 Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile Ile Gln Asn Phe Cys
 690 695 700
 His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu Cys
 705 710 715 720
 Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile
 725 730 735
 Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser
 740 745 750
 Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro
 755 760 765
 Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val
 770 775 780
 Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys
 785 790 795 800
 Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile
 805 810 815
 Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn

ES 2 379 413 T3

			820					825				830			
Phe	Cys	Ser	Ala	Val	Gln	Tyr	Gly	Asn	Ala	Gln	Ile	Ile	Glu	Cys	Leu
		835					840					845			
Lys	Glu	Asn	Lys	Lys	Gln	Leu	Ser	Thr	Arg	Cys	His	Gln	Lys	Val	Phe
	850					855					860				
Lys	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Met	Met	Asp	Pro	Glu	Leu	Asp	Tyr	Thr	Leu
865					870					875				880	
Met	Arg	Val	Cys	Lys	Gln	Met	Ile	Lys	Arg	Phe	Cys	Pro	Glu	Ala	Asp
			885						890					895	
Ser	Lys	Thr	Met	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gln	Asn	Lys	Asn	Ser	Glu	Leu
			900					905					910		
Met	Asp	Pro	Lys	Cys	Lys	Gln	Met	Ile	Thr	Lys	Arg	Gln	Ile	Thr	Gln
		915					920					925			
Asn	Thr	Asp	Tyr	Arg	Leu	Asn	Pro	Met	Leu	Arg	Lys	Ala	Cys	Lys	Ala
	930					935					940				
Asp	Ile	Pro	Lys	Phe	Cys	His	Gly	Ile	Leu	Thr	Lys	Ala	Lys	Asp	Asp
945					950					955					960
Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Gln	Val	Ile	Ser	Cys	Leu	Lys	Leu	Arg	Tyr	Ala
				965						970				975	
Asp	Gln	Arg	Leu	Ser	Ser	Asp	Cys	Glu	Asp	Gln	Ile	Arg	Ile	Ile	Ile
			980					985					990		
Gln	Glu	Ser	Ala	Leu	Asp	Tyr	Arg	Leu	Asp	Pro	Gln	Leu	Gln	Leu	His
		995					1000					1005			
Cys	Ser	Asp	Glu	Ile	Ser	Ser	Leu	Cys	Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Gln
	1010					1015					1020				
Glu	Gln	Thr	Gly	Gln	Val	Glu	Glu	Cys	Leu	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Lys
1025				1030						1035					1040
Ile	Lys	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	Lys	Glu	Val	Leu	Asn	Met	Leu	Lys	Glu
				1045						1050				1055	
Ser	Lys	Ala	Asp	Ile	Phe	Val	Asp	Pro	Val	Leu	His	Thr	Ala	Cys	Ala
			1060					1065						1070	
Leu	Asp	Ile	Lys	His	His	Cys	Ala	Ala	Ile	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Arg
		1075					1080					1085			
Gln	Met	Ser	Cys	Leu	Met	Glu	Ala	Leu	Glu	Asp	Lys	Arg	Val	Arg	Leu
	1090					1095						1100			
Gln	Pro	Glu	Cys	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Asp	Arg	Ile	Glu	Met	Trp	Ser
1105					1110					1115					1120
Tyr	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Pro	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser	Asp	Leu	Ala	Met
				1125						1130				1135	
Gln	Val	Met	Thr	Ser	Pro	Ser	Lys	Asn	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Ile	Ser
			1140						1145				1150		
Gly	Ser	Ile	Cys	Ile	Leu	Phe	Leu	Ile	Gly	Leu	Met	Cys	Gly	Arg	Ile
		1155					1160						1165		
Thr	Lys	Arg	Val	Thr	Arg	Glu	Leu	Lys	Asp	Arg					
	1170						1175								

- <210> 19
- <211> 3779
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 19

```

gcgtcgagct cgccgaggac tcaagatggc ggcgtgtgga cgtgtacgga ggatgttccg 60
cttgtcggcg gcgctgcatc tgctgctgct attcgcggcc ggggccgaga aactccccgg 120
ccagggcgtc cacagccagg gccaggggcc cggggccaac tttgtgtcct tcgtagggca 180
ggcgggagc ggcggcccgg cgggtcagca gctgccccag ctgcctcagt catcgagct 240
tcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccgcccg agccgccttt 300
cccggcgggt gggcctccgg cccggcgggg aggagcgggg gctggtgggg gctggaagct 360
ggcggaggaa gagtcctgca gggaggacgt gaccgcgctg tgcctaagc acacctggag 420
caacaacctg gcggtgctcg agtgctgca gtagtgagg gaggcctgaaa atgaaatttc 480

```

ES 2 379 413 T3

ttcagactgc aatcatttgt tgtggaatta taagctgaac ctaactacag atcccaaatt 540
 tgaatctgtg gccagagagg tttgcaaatc tactataaca gagattaaag aatgtgctga 600
 tgaaccgggt ggaaaaggtt acatggttct ctgcttggtg gatcaccgag gcaacatcac 660
 tgagtatcag tgtcaccagt acattaccaa gatgacggcc atcattttta gtgattaccg 720
 ttaaatctgt ggcttcatgg atgactgcaa aaatgacatc aacattctga aatgtggcag 780
 tattcggtt ggagaaaagg atgcacattc acaaggtgag gtggtatcat gcttggagaa 840
 aggctgggtg aaagaagcag aagaaagaga acccaagatt caagttctg aactctgcaa 900
 gaaagccatt ctccgggtgg ctgagctgtc atcggatgac tttcacttag accggcatt 960
 atattttgct tgccgagatg atcgggagcg tttttgtgaa aatacacaag ctggtgaggg 1020
 cagagtgtat aagtgcctct ttaaccataa atttgaagaa tccatgagtg aaaagtgtcg 1080
 agaagcactt acaaccggcc aaaagctgat tgcccaggat tataaagtca gttattcatt 1140
 ggccaaatcc tgtaaaagtg acttgaagaa ataccgggtc aatgtggaaa accttcccg 1200
 atcgcgtgaa ctcgagctct cctacttgtt aatgtgcctg gagtcagctg tacacagagg 1260
 gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgctggat taccgacgca tgttgatgga 1320
 agacttttct ctgagccctg agatcatcct aagctgtcgg ggggagattg aaacaccattg 1380
 ttccggatta catcgaaaag ggccggaccct aactgtctg atgaaagtag ttcgagggga 1440
 gaaggggaac cttggaatga actgccagca ggcgcttcaa acactgattc aggagactga 1500
 ccctggtgca gattaccgca ttgatcagagc tttgaatgaa gcttgtgaa ctgtaatcca 1560
 gacagcctgc aaacatataa gatctggaga ccaatgatc ttgtcgtgcc tgatggaaca 1620
 tttatacaca gagaagatgg tagaagactg tgaacaccgt ctcttagagc tgcagattt 1680
 catctcccgg gattggaagc tggaccctgt cctgtaccgc aagtgccagg gagacgctc 1740
 tcgtctttgc cacaccacag gttggaatga gaccagtga tttatgcctc agggagctgt 1800
 gttctcttgt ttatacagac acgcctaccg cactgaggaa cagggaaagga ggctctcacg 1860
 ggagtgccga gctgaagtcc aaaggatcct acaccagcgt gccatggatg tcaagctgga 1920
 tcctgccctc caggataagt gcctgattga tctgggaaaa tgggtcagtg agaaaaacga 1980
 gactggacag gagctggagt gccttcagga ccatctggat gacttgggtg tggagtgtag 2040
 agatatagtt gcaacctca ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagccttctg 2100
 gatgagagcc tgtgagccca taattcagaa ctctgccac gatgtggcag ataaccagat 2160
 agactctggg gacctgatgg agtgtctgat acagaacaaa caccagaagg acatgaacga 2220
 gaagtgtgcc atcggagtta cccacttcca gctggtgcag atgaaggatt ttcggttttc 2280
 ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgttgaag ctttgcccaa acataaaaaa 2340
 gaaggtggac gtggtgatct gcctgagcac gaccgtgctc aatgacactc tgcaggaagc 2400
 caaggagcac aggtgtccc tgaagtgcg caggcagctc cgtgtggagg agctggagat 2460
 gacggaggac atccgcttg agccagatct atacgaagcc tgcaagagtg acatcaaaaa 2520
 cttctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaaaca 2580
 gaagcagcta agcaccogct gccacaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat 2640
 ggaccagag ctagactaca ccctcatgag ggtctgcaag cagatgataa agaggttctg 2700
 tccggaagca gattctaaaa ccatgttgca gtgcttgaag caaaataaaa acagtgaatt 2760
 gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgccag atcaccaga acacagatta 2820
 ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac atcctaata tctgtcacgg 2880
 tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagtcatct cttgcctgaa 2940
 gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat 3000
 ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tcctcagctc cagctgact gctcagacga 3060
 gatctccagt ctatgtgctg aagaagcagc agccaagag cagacaggtc aggtggagga 3120
 gtgcctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg tgtaaaaagg aagtgtctaa 3180
 catgctgaag gaaagcaag cagacatctt tgttgaccg gtacttcata ctgcttctgc 3240
 cctggacatt aaacaccact gcgcagccat caccctggc cgcgggcgtc aaatgtcctg 3300
 tctcatggaa gcaactggagg ataagcgggt gaggttacag cccgagtgca aaaagcgcct 3360
 caatgaccgg attgagatgt ggagttacgc agcaaaggtg gcccagcag atggcttctc 3420
 tgatcttggc atgcaagtaa tgacgtctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag 3480
 tgggagcadc tgtatattgt tcctgattgg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt 3540
 gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata caggtcagag acaatggctt ataaaggttt 3600
 agtgtggctc caggatgtga caggcagctc agcctgacct ttctgcacac tccagacaaa 3660
 ctcccagac aagctccttt gtgcctctac gtggagagg tgtgaaagt tatcacatta 3720
 aaagatggag gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaa aaaaaaaaaa 3779

- <210> 20
- <211> 1203
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 20

ES 2 379 413 T3

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala
1 5 10 15
Leu His Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly
20 25 30
Gln Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser
35 40 45
Phe Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Gly Gln Gln Leu Pro
50 55 60
Gln Leu Pro Gln Ser Ser Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
65 70 75 80
Gln Gln Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Phe Pro Ala Gly Gly
85 90 95
Pro Pro Ala Arg Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Trp Lys Leu
100 105 110
Ala Glu Glu Glu Ser Cys Arg Glu Asp Val Thr Arg Val Cys Pro Lys
115 120 125
His Thr Trp Ser Asn Asn Leu Ala Val Leu Glu Cys Leu Gln Asp Val
130 135 140
Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala
165 170 175
Arg Glu Val Cys Lys Ser Thr Ile Thr Glu Ile Lys Glu Cys Ala Asp
180 185 190
Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser Cys Leu Val Asp His Arg
195 200 205
Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys Met Thr
210 215 220
Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp
225 230 235 240
Cys Lys Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly
245 250 255
Glu Lys Asp Ala His Ser Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys
260 265 270
Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu Pro Lys Ile Gln Val Ser
275 280 285
Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser Ser Asp
290 295 300
Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg
305 310 315 320
Glu Arg Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys
325 330 335
Cys Leu Phe Asn His Lys Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg
340 345 350
Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile Ala Gln Asp Tyr Lys Val
355 360 365
Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys Tyr Arg
370 375 380
Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr
385 390 395 400
Leu Leu Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser
405 410 415
Ser Glu Cys Gln Gly Glu Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu
420 425 430
Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu Ser Cys Arg Gly Glu Ile
435 440 445
Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu His Cys
450 455 460
Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys
465 470 475 480

ES 2 379 413 T3

Gln Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp
 485 490 495
 Tyr Arg Ile Asp Arg Ala Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln
 500 505 510
 Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp Pro Met Ile Leu Ser Cys
 515 520 525
 Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys Glu His
 530 535 540
 Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp
 545 550 555 560
 Pro Val Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His
 565 570 575
 Thr His Gly Trp Asn Glu Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val
 580 585 590
 Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg Thr Glu Glu Gln Gly Arg
 595 600 605
 Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu His Gln
 610 615 620
 Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys Leu
 625 630 635 640
 Ile Asp Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Glu
 645 650 655
 Leu Glu Cys Leu Gln Asp His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg
 660 665 670
 Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr Glu Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln Ile
 675 680 685
 Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile Ile Gln Asn Phe Cys
 690 695 700
 His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu Cys
 705 710 715 720
 Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile
 725 730 735
 Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser
 740 745 750
 Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro
 755 760 765
 Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val
 770 775 780
 Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys
 785 790 795 800
 Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile
 805 810 815
 Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn
 820 825 830
 Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu
 835 840 845
 Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe
 850 855 860
 Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu
 865 870 875 880
 Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp
 885 890 895
 Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu
 900 905 910
 Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln
 915 920 925
 Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala
 930 935 940
 Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp
 945 950 955 960
 Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala

ES 2 379 413 T3

```

          965          970          975
Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile
          980          985          990
Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His
          995          1000          1005
Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln
          1010          1015          1020
Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
          1025          1030          1035          1040
Ile Lys Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu
          1045          1050          1055
Ser Lys Ala Asp Ile Phe Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala
          1060          1065          1070
Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg
          1075          1080          1085
Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu
          1090          1095          1100
Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
          1105          1110          1115          1120
Tyr Ala Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met
          1125          1130          1135
Gln Val Met Thr Ser Pro Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser
          1140          1145          1150
Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile
          1155          1160          1165
Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys Asp Arg Leu Gln Tyr Arg Ser
          1170          1175          1180
Glu Thr Met Ala Tyr Lys Gly Leu Val Trp Ser Gln Asp Val Thr Gly
          1185          1190          1195          1200
Ser Pro Ala

```

- <210> 21
- <211> 2288
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 21

ES 2 379 413 T3

caaaaacttc tgttccgctg tgcaatatgg caacgctcag attatcgaat gtctgaaaga 60
 aaacaagaag cagctaagca cccgctgcca ccaaaaagta ttttaagctgc aggagacaga 120
 gatgatggac ccagagctag actacaccct catgagggtc tgtaagcaga tgataaagag 180
 gttctgtccg gaagcagatt ctaaaacat gttgcagtgc ttgaagcaaa ataaaaacag 240
 tgaattgatg gatcccaat gcaaacagat gataaccaag cgccagatca cccagaacac 300
 agattaccgc ttaaacccca tgtaagaaa agcctgtaaa gctgacattc ctaaattctg 360
 tcacggatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta gaaggacaag tcactctctg 420
 cctgaagctg agatatgctg accagcgcct gtcttcagac tgtgaagacc agatccgaat 480
 cattatccag gagtccgccc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc 540
 agacgagatc tccagtctat gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcagg 600
 ggaggagtgc ctcaaggta acctgctcaa gatcaaaaaca gaattgtgta aaaaggaagt 660
 gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaagcaga catctttgtt gaccgggtac ttcatactgc 720
 ttgtgccctg gacattaac accactgcgc agccatcacc cctggccgcg ggcgtcaaat 780
 gtcctgtctc atggaagcac tggaggataa gcgggtgagg ttacagcccg agtgcaaaaa 840
 gcgcctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca aagggtggccc cagcagatgg 900
 cttctctgat cttgccatgc aagtaatgac gtctccatct aagaactaca ttctctctgt 960
 gatcagtggg agcatctgta tattgttctt gattggcctg atgtgtggac ggatcaccaa 1020
 gcgagtgaca cgagagctca aggacaggta gagccacctt gaccaccaa ggaactacct 1080
 atccagtgcc cagtttgtag agcctcttgc tatagcatcc ccaactcacct cgctctctc 1140
 agaagtgaca ccaaccccggt gttagagcat tagcagatgt ccaactgcgtt gtcccatcca 1200
 gcctccactc gtgtccatgg tgcctcctc ctccctcaccg tgcagcagca gcagctggtc 1260
 gctgggggta ctgcctttgt ttggcagact tggtttacct gcctgtagtc aagtctctct 1320

cataccaaca gaacttccgg tacttccaga accaactcac ctgacctgca actcaaaggc 1380
 ttttttaaga aaaccaccaa aaaaaaaaaat ttttttaag aaaaaaatgt atatagtaac 1440
 gcatctcctc caggcttgat ttgggcaatg gggttatgtc tttcatatga ctgtgtaaaa 1500
 caaagacagg acttggaggg gaagcacacc acccagtggt ccatgactga ggtgtctcgt 1560
 tcactctca gaagcgcctt gggcctcgc cagggccgtg gtcttcaccg aggcgtgggt 1620
 gggcagccgt tccccaggct gtgtggggtc ctgctttctt ctgctgagac agtgacgctt 1680
 tccagtttcc accctaataca gccactgctg gtcacagccc cacagccatg ggtatttctg 1740
 tggctcctc gcttcattga agcaaagcat gagccttctt agacaagggc agctggggag 1800
 gggaaaggac cggaagtttg tgaagttgaa cagtccatcc atctgactg agaggctgga 1860
 tcctgagtcc cggggcagca ggtatcccagg aaccttctc ctccagggca gcacaggact 1920
 cagccgtgtc tggaccggcc ctgctgagcc tacagtcaact ctggaagctc tgcgcttcat 1980
 caggaggcag gactgtggcg ggaggggtcc ttgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca 2040
 ggaagtggga gccagaggtt tgactcaact tgctttattt ttcaggctac aatacaggtc 2100
 agagacaatg gcttataaag gtttagtgtg gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg 2160
 acctttctgc aactccaga caaacttccc agacaagctc ctttgtgcct ctacgtggag 2220
 aggtgtgga aagttatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
 aaaaaaaaaa 2288

- <210> 22
- <211> 309
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 22

ES 2 379 413 T3

```

Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu Met Arg Val Cys Lys Gln
 1      5      10      15
Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp Ser Lys Thr Met Leu Gln
 20      25      30
Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys
 35      40      45
Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu
 50      55      60
Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys
 65      70      75      80
His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp Ser Glu Leu Glu Gly Gln
 85      90      95
Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu Ser Ser
 100     105     110
Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp
 115     120     125
Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser
 130     135     140
Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val
 145     150     155     160
Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys Ile Lys Thr Glu Leu Cys
 165     170     175
Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp Ile Phe
 180     185     190
Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His
 195     200     205
Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met
 210     215     220
Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys
 225     230     235     240
Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser Tyr Ala Ala Lys Val Ala
 245     250     255
Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr Ser Pro
 260     265     270
Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu
 275     280     285
Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg
 290     295     300
      Glu Leu Lys Asp Arg
      305

```

- <210> 23
- <211> 2486
- 5 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 23

ES 2 379 413 T3

```

aatttagcca gctgtggtgg cacatacctg taatcccagc tacttgagag actgagggcag 60
gagaatcact tgaaccggga gatggagttt gcagtgagcc gagatggtgc cactgtactc 120
cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180
catttcaagc tggagattt ggttccctaa ctttgagcct agctctttca ttaaagtaat 240
aataaaagta gaactctaca tttatataat ggttttgact ttccaaagtg attttcacat 300
ctcagcagtc ctgtgaagga ctaaataaagg tgtttcaggg tagacttggc attgtgtttt 360
gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtgacaga attgaaagta aagcctgatt 420
ctcttgctgc aaggcgactt tgctatctag aagccagggc cactagacaa gatgcagtca 480
acaataaagt ctccagaaca tatgacatct ccagcctaaa ccaagctcac ctttccatgc 540
tggctccctc atgcagacgg aggacatccg cttggagcca gatctatacg aagcctgcaa 600
gagtgcacat aaaaacttct gttccgctgt gcaatatggc aacgctcaga ttatcgaatg 660
tctgaaagaa aacaagaagc agctaagcac ccgctgccac caaaaagtat ttaagctgca 720
ggagacagag atgatggacc cagagctaga ctacaccctc atgagggctc gcaacagat 780
gataaagagg ttctgtccgg aagcagattc taaaacctag ttgcagtgtc tgaagcaaaa 840
taaaaacagt gaattgatgg atcccaaagc caaacagatg ataaccaagc gccagatcac 900
ccagaacaca ggtaagatct tggcttggct ctctctggcc cgtggagtat ctgaaaagga 960
attcagtggc tgtagagtga cctgctcaaa ctcccagggc tttgttgctt gggaatttta 1020
agggaggagt ctgagtgtaa gcagggcctt cctccttga ggagcatcca gaaaaatgga 1080
gggagagtcg ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc 1140
agaaggaatc aggccggcag tccttggaag gaaaaatcta gaaattcaat aaaacttcat 1200
gagtgtgccg ggagaatgta cgggtaatct gattcggaac agaaacattt cacctctgag 1260
ttggaagacc tcgtaagtta atggtcacag tgagttggat attgtatttc tttttcagtg 1320
ttctcaaaag tgtctgttat ggggaaggtt gctgatgtcc ccttgatttt tctgaggact 1380
ccttagagta ttggagtctg cacaaaaccg cgcagagtag aaagattcct gaggacctcc 1440
agaagtactc gttaacaagt catattgctg attaaaaaca gtgtagtgtg agctcagtaa 1500
atgtttattg aatagataaa tccatgggtg tagtcatgat cattgacata atatgctccc 1560
tttaggaagg tggatatcta aaaatgtgtg aatcaggtgg aatgttttgt cacatgctca 1620
ctgctttcta ctctagatta ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac 1680
attcctaaat tctgtcacgg tctcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga 1740
caagtcatct cttgcctgaa gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa 1800
gaccagatcc gaatcattat ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tcctcagctc 1860
cagctgcact gctcagacga ggtgggattt gcgtgcaaaa ctggttacgc acagagctgc 1920
tcagagaagt ttccactgga gaaaagttgt ttactttctc tcccttcagc cgtgaatgat 1980
ctggtgaatt gaaggccatc ttctaggctc tccatggtct gcattcctgt tctttgtaac 2040
actgaattca acttggcatt agtcttgaca ctctaaagcg ttgttcata tttctctgtt 2100
gaacaagggg gttctttcat tatagctctc tgtaaatttg ttcttccctt cttcttattc 2160
tggatggtaa acccaagacc tgccagaaag ataaaagtgc tttcagctgg gcacggtggc 2220
tcacgcctgt aatcccaaca ctttgggagg ccaaggaggg tggatcatct gaggtcagga 2280
gttcaagacc agcctggcta acatggagaa atctgtctct actaaaaata caaaaaatta 2340
gccagggcgtg gtggcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat 2400
cacttgaacc cgggagggcg tggttgacgt gagctgagat catgccactg caccctcagc 2460
tgggcgacag aggaagactc tgtctc                                     2486

```

- <210> 24
- <211> 156
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 24

Met Gln Thr Glu Asp Ile Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys

ES 2 379 413 T3

1				5					10					15		
Lys	Ser	Asp	Ile	Lys	Asn	Phe	Cys	Ser	Ala	Val	Gln	Tyr	Gly	Asn	Ala	
			20					25					30			
Gln	Ile	Ile	Glu	Cys	Leu	Lys	Glu	Asn	Lys	Lys	Gln	Leu	Ser	Thr	Arg	
		35					40					45				
Cys	His	Gln	Lys	Val	Phe	Lys	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Met	Met	Asp	Pro	
						55					60					
Glu	Leu	Asp	Tyr	Thr	Leu	Met	Arg	Val	Cys	Lys	Gln	Met	Ile	Lys	Arg	
65					70					75				80		
Phe	Cys	Pro	Glu	Ala	Asp	Ser	Lys	Thr	Met	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gln	
				85					90					95		
Asn	Lys	Asn	Ser	Glu	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Cys	Lys	Gln	Met	Ile	Thr	
								100						110		
Lys	Arg	Gln	Ile	Thr	Gln	Asn	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Ala	Trp	Leu	Ser	
		115					120							125		
Trp	Pro	Arg	Gly	Val	Ser	Glu	Lys	Glu	Phe	Ser	Gly	Cys	Arg	Val	Thr	
		130					135					140				
Cys	Ser	Asn	Ser	Gln	Gly	Phe	Val	Ala	Trp	Glu	Phe					
145					150						155					

<210> 25
 <211> 842
 5 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 25

```

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactacaa 60
agtcctgttt gctgattctt cttgtggccc tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg 120
agtgttacca gtgctatgga gtcccatttg agacttcttg cccatcaatt acctgccctt 180
accctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga 240
aagtaaagaa caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc 300
tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttctt gttgccagga agacctctgc aatgtagcag 360
ttccaatgg aggcagcacc tggacatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag 420
tcctcctgca gaccttgctc tgatggctct cccaatgacc tccacccttg tccttttatc 480
ctcatgtgca acaattcttc ctggagccct ctagtatgga attatgagtt atagaagctc 540
caaggtggga gtagtgtgtg aaataccatg ttttgctt atagcccctg ctgggtaggt 600
aggtgctcta atcctctcta gggctttcaa gtctgtactt cctagaatgt cattttgttg 660
tggattgctg ctcatgaccc tggaggcaca cagccagcac agtgaagagg cagaattcca 720
aggtattatg ctatcaccat ccacacataa gtatctgggg tcctgcaatg ttcccacatg 780
tatcctgaat gtcccctgt tgagtccaat aaacccttg ttctcccaa aaaaaaaaaa 840
aa 842
    
```

10
 <210> 26
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 26

ES 2 379 413 T3

```

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

Ser Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Val Ala Val Pro Asn Gly Gly
 100          105          110
Ser Thr Trp Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val
 115          120          125
Leu Leu Gln Thr Leu Leu
 130

```

- <210> 27
- <211> 862
- 5 <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 27

```

atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga 60
tggacacttc tcacactaca aagtcctgtg tgctcattct tcttgtggcc ctactgtgtg 120
cagaaagagc tcagggactg cagtgtctag agtgctatgg agtgccaatt gagacttctt 180
gcccagcagt tacctgccgc gcctctgatg gattctgcat tgctcaaac atagaattga 240
ttgaggactc tcaaagaagg aaactaaaga cccgtcagtg cctttctttc tgcctgctg 300
gtgtgccaat cagggatcct aacatcaggg agaggacttc ctgttgccgc gaagacctct 360
gcaatgcagc agttcccact gcaggtagca cctggaccat ggcaggggtg cttctgttca 420
gcctgagctc agtcgtcctg cagaccttgc tctgatggtc ctccaatga cccccacct 480
tttcctttta tcttcatgtg caaccactct ttccctggagt cctctagtga caaattatat 540
gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc ctgtttcacc tttatagccc 600
ctgctgggta agtgcccgac tcctctctag ggctttcaaa tctgtacttc ttgcaatgcc 660
atattagttg ggatttctat tcttggccct ggaggcatgt ggccagcaca tgcaacaggc 720
agtattccaa ggtattatag tatcaccatc cacacataag tatctggggc cctgcagggt 780
tcccatgtat gcctgtcaat gaccctgtt gagtccaata aaagctttgt tctcccagcc 840
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 862

```

- 10 <210> 28
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- 15 <400> 28

ES 2 379 413 T3

```

Met Asp Thr Ser His Thr Thr Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val
 1      5      10      15
Ala Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Gln Cys Tyr Glu Cys
 20      25      30
Tyr Gly Val Pro Ile Glu Thr Ser Cys Pro Ala Val Thr Cys Arg Ala
 35      40      45
Ser Asp Gly Phe Cys Ile Ala Gln Asn Ile Glu Leu Ile Glu Asp Ser
 50      55      60
Gln Arg Arg Lys Leu Lys Thr Arg Gln Cys Leu Ser Phe Cys Pro Ala
 65      70      75      80
Gly Val Pro Ile Arg Asp Pro Asn Ile Arg Glu Arg Thr Ser Cys Cys
 85      90      95
Ser Glu Asp Leu Cys Asn Ala Ala Val Pro Thr Ala Gly Ser Thr Trp
 100     105
Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val Val Leu Gln
 115     120     125
Thr Leu Leu
 130

```

- <210> 29
- <211> 806
- 5 <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 29

```

gcccaccccc gccagcccg tgcctataag gccttggcaa tgcagggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
tgtggtctgc ccggccagct ctcgcttctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca cccagctaca ccctgcaagg 300
ccaggtcagc agcggcacca gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa 360
gctgcacaac gctgcaccca cccgcaccgc cctcgccac agtgcctca gcctggggct 420
ggccctgagc ctcttgccg tcattttagc cccagcctg tgaccttccc cccaggggag 480
gcccctcatg cctttccttc cctttctctg gggattccac acctctcttc cccagccgca 540
acgggggtgc caggagcccc aggctgaggg cttccccgaa agtctgggac caggtccagg 600
tggtgatgga atgctgatga cttggagcag gccccacaga cccacagag gatgaagcca 660
ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
cccgatttc acactccttc tgtttgttg cgttttattt ttgtactcaa atctctacat 780
ggagataaat gatttaaacc agaaaa 806

```

- 10 <210> 30
- <211> 128
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- 15 <400> 30

```

Met Arg Thr Ala Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Thr Gly
 1      5      10      15
Pro Ala Leu Thr Leu Arg Cys His Val Cys Thr Ser Ser Ser Asn Cys
 20      25      30
Lys His Ser Val Val Cys Pro Ala Ser Ser Arg Phe Cys Lys Thr Thr
 35      40      45
Asn Thr Val Glu Pro Leu Arg Gly Asn Leu Val Lys Lys Asp Cys Ala
 50      55      60
Glu Ser Cys Thr Pro Ser Tyr Thr Leu Gln Gly Gln Val Ser Ser Gly
 65      70      75      80
Thr Ser Ser Thr Gln Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Glu Lys Leu
 85      90      95
His Asn Ala Ala Pro Thr Arg Thr Ala Leu Ala His Ser Ala Leu Ser
 100     105     110
Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ile Leu Ala Pro Ser Leu
 115     120     125

```

ES 2 379 413 T3

<210> 31
 <211> 1145
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 5 <400> 31

```

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt 60
acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgctttggtt tgtgacctcc aggcaggacg 120
gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtgctc tggctgccct tctgggtgtg 180
gagcgagcca gctcgctgat gtgcttctcc tgcttgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
ctgaagccga ccatctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc 300
ggcattggga atctcgtgac atttggccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc 360
cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgtg gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
tttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
gccgggctgc tgctgagcct gctgccggcc ctgctgcggg ttggcccctg accgccaga 540
ccctgtcccc cgatccccc gctcaggaag gaaagcccag ccctttctgg atccccagt 600
gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgcct gatctgtgcc cttggtccca ggtcaggccc 660
acccctgca cctccacctg ccccagcccc tgcctctgcc caagtgggccc agctgccctc 720
acttctgggg tggatgatgt gaccttcctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct 780
ggagtcttac ggtccaacat cagaccaagt cccatggaca tgctgacagg gtccccaggg 840
agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
    
```

```

gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggagggagg tgtgccagca gcctggagag 960
cctcagtccc tgtagcccc tgccctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg 1020
ggggttgggg tttctgccac ttccgggtct aggccctgcc caaatccagc cagtctgcc 1080
ccagcccacc cccacattgg agccctcctg ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
tcccc 1145
    
```

<210> 32
 10 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 32

```

Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu
 1          5          10          15
Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn
      20          25          30
Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys
      35          40          45
Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly
      50          55          60
His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly
      65          70          75          80
Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe
      85          90          95
Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr
      100          105          110
Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg
      115          120          125
Phe Gly Pro
      130
    
```

15
 <210> 33
 <211> 877
 <212> ADN
 20 <213> Mus musculus
 <400> 33

ES 2 379 413 T3

```

actgtgcctg caacctggtc agagaggaag taaggactgg tgtcaggagg gagctgctag 60
gtttgatctg tgcagccctt ctccaaggat ggacagtgtg cacactacaa agtctgtgtg 120
actcatcctt cttgtgggtc tattgtgtgc agaaagagct caggggctgg agtgctataa 180
ctgcctggga gtttcaactg gaattgcctg caaatcaatt acctgcccct accctgatgc 240
agtctgcatt tctcagcagg tagaacttat tgtggactct caaagaagga aagtaaagaa 300
caaactctgc tttcctttct gcctgctaa tcttgaaaat atggagatcc tgggtactac 360
tgtcaacgtg aatacttctt gttgcaagga agacctctgc aatgcaccat tttccactgg 420
aggcagcacc tggaccatga caagggtgct tctgttaaat ctgggctcgg tcttctctgca 480
gaccttgctg taaaagggtc ttccaaggac ctccaccctt gttgttttat cctcatttgc 540
aactattcct tctcggagcc ctctagtgat gaattatgag atattgaagc tccaagggtg 600
gagtagtgtt tgtggaatac gttgtttcaa ctttatagcc cctgcttggg aaatgcccc 660
ctcctctcta ggaatttcaa atatgtactt cctagaatgc cattttgttg tggcttgcta 720
atcttggccc tggaggcccg tggctagcag agggtagagg cagaattcca aggtattaag 780
ccatcaccat ccacacataa gtgtctgagg ttctgcagga ttctcatgta tgcggcttta 840
tgtccccttg ttgagtccaa taaacccttt gttctcc 877

```

<210> 34
 <211> 134
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 34

Met Asp Ser Cys His Thr Thr Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val

```

      1              5              10              15
Val Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Glu Cys Tyr Asn Cys
      20              25              30
Leu Gly Val Ser Leu Gly Ile Ala Cys Lys Ser Ile Thr Cys Pro Tyr
      35              40              45
Pro Asp Ala Val Cys Ile Ser Gln Gln Val Glu Leu Ile Val Asp Ser
      50              55              60
Gln Arg Arg Lys Val Lys Asn Lys Leu Cys Phe Pro Phe Cys Pro Ala
      65              70              75              80
Asn Leu Glu Asn Met Glu Ile Leu Gly Thr Thr Val Asn Val Asn Thr
      85              90              95
Ser Cys Cys Lys Glu Asp Leu Cys Asn Ala Pro Phe Ser Thr Gly Gly
      100             105             110
Ser Thr Trp Thr Met Thr Arg Val Leu Leu Leu Asn Leu Gly Ser Val
      115             120             125
Phe Leu Gln Thr Leu Leu
      130

```

10

<210> 35
 <211> 710
 <212> ADN
 15 <213> Mus musculus
 <400> 35

```

ctgcagccag gtctgagagg aagtaaggac tgggtgcagg agggagctgc taggtgacaa 60
aggaagaac cctcaggata gggctgtggt gggagtgaga ttaggaaaga agagctgggt 120
gggtggtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca gggaaagctg tgtagagggt 180
tggagggagg gaatattgga tggctgagcc gtgtgagagc ccaggggtgt gatcaggggt 240
ctattaactg gctccaactt ccaaggtttt atctgtgcag cccttctcca aggatggaca 300
cttctcacga gataaagtcc tgtgtgctga tcttcttgtg gaccctactc tgtgcagaaa 360
gagctcaggg actggagtgt taccagtgtc atggagtccc atttgagact tcttgcccat 420
catttacctg cccctaccct gatggattct gtgttgctca ggaggaagaa tttattgcaa 480
actctcaaag aaagagagta aagagccgtt cttgccatcc tttctgccct gatgaaattg 540
aaaagaagtt tatcctggat cctaacacca agatgaatat ttctgttgc caggaagacc 600
tctgcaatgc agcagtccc actggaggca gctcctggac cacggcaggg gtgcttctgt 660
tcagcctggg ctcagtctc ctgcagaccc tgatgtgatg gtccccacc 710

```

20 <210> 36
 <211> 134

ES 2 379 413 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36

Met	Asp	Thr	Ser	His	Glu	Ile	Lys	Ser	Cys	Val	Leu	Ile	Leu	Leu	Val
1				5				10						15	
Thr	Leu	Leu	Cys	Ala	Glu	Arg	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Cys	Tyr	Gln	Cys
			20					25					30		
Tyr	Gly	Val	Pro	Phe	Glu	Thr	Ser	Cys	Pro	Ser	Phe	Thr	Cys	Pro	Tyr
		35					40					45			
Pro	Asp	Gly	Phe	Cys	Val	Ala	Gln	Glu	Glu	Glu	Phe	Ile	Ala	Asn	Ser
	50						55				60				
Gln	Arg	Lys	Arg	Val	Lys	Ser	Arg	Ser	Cys	His	Pro	Phe	Cys	Pro	Asp
65				70						75					80
Glu	Ile	Glu	Lys	Lys	Phe	Ile	Leu	Asp	Pro	Asn	Thr	Lys	Met	Asn	Ile
			85						90					95	
Ser	Cys	Cys	Gln	Glu	Asp	Leu	Cys	Asn	Ala	Ala	Val	Pro	Thr	Gly	Gly
			100					105					110		
Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Ser	Val
		115					120						125		
Leu	Leu	Gln	Thr	Leu	Met										

5 130

<210> 37
 <211> 1735
 <212> ADN
 10 <213> Mus musculus
 <400> 37

```

ggtatcagag gtagagcccgt gctcttcagc ggagaagatc ccctacctgg cgcgccggcca 60
ctttctgtgg gccgtgggggt cctcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgctgttcc 120
acacgcgcct ttcccagggc tcccgcgccc gttcctgctt ggccgcccgc cgctccaaca 180
gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcaggggccgc cagcggccgc gaggccctga 240
gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggcgggtggg aggcgcgcgc cccggggcgg 300
gcggggctcc ccctaccggc cagaccgggg gagaggcgcg cggaggctgc gaaggttcca 360
gaagggcggg gagggggcgc cgcgcgctga ccctccctgg gcaccgctgg ggacgatggc 420
gctgctcgcc ttgctgctgg tcgtggccct acccggggtg tggacagacg ccaacctgac 480
tgcgagacaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gagggtgaca atagagtgtg 540
gtgtcatggt tgtgagagag aaaacacttt cgagtgccag aaccaagga ggtgcaaag 600
gacagagcca tactgctta tagcggccgt gaaaatattt ccacgttttt tcatgggtgc 660
gaagcagtg cccgctggtt gtgcagcgtt ggagagacc aagccagagg agaagcggtt 720
tctcctggaa gagcccatgc ctttctttta cctcaagtgt tgtaaaattc gctactgcaa 780
tttagagggg ccacctatca actcatcagt gttcaagaa tatgctggga gcatgggtga 840
gagctgtggt gggctgtggc tggccatcct cctgctgctg gcctccattg cagccggcct 900
cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgagcct tccggagcat ggactcgctc 960
cagaccgttg tcacctgttg cattaactt gttttctggt gattacctct tggtttgact 1020
tcccagggtc ttgggatggg agagtgggga tcaggtgcag ttggctctta accctcaagg 1080
gttctttaac tcacattcag aggaagtcca gatctcctga gtagtgattt tggtgacaag 1140
tttttctctt tgaatcaaa ccttgtaact catttattgc tgatggccac tcttttctct 1200
gactcccctc tgcctctgag ggcttcagta ttgatgggga gggaggccta agtaccactc 1260
atggagagta tgtgctgaga tgcttccgac cttcagggtg acgcaggaac actgggggag 1320
tctgaatgat tggggtgaag acatccctgg agtgaaggac tcctcagcat ggggggcagt 1380
ggggcacacg ttagggctgc ccccattcca gtggtggagg cgctgtggat ggctgctttt 1440
cctcaacctt tccaccaga tccaggagg cagaagataa ctaattgtgt tgaagaaact 1500
tagacttcac ccaccagctg gcacaggtgc acagattcat aaattccac acgtgtgtgt 1560
tcaacatctg aaacttaggc caagtagaga gcatcagggt aaatggcgtt catttctctg 1620
ttaagatgca gccatccatg gggagctgag aatcagact caaagtcca ccaaaaacaa 1680
atacaagggg acttcaaaaag ttcacgaaaa aattgaatta aaagataaaa attaa 1735
    
```

15 <210> 38
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

Met	Arg	Leu	Gln	Arg	Pro	Arg	Gln	Ala	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Arg	Ala
1				5					10					15	
Pro	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Ser	Pro	Tyr	Arg	Pro	Asp	Pro	Gly	Arg	Gly
			20					25					30		
Ala	Arg	Arg	Leu	Arg	Arg	Phe	Gln	Lys	Gly	Gly	Glu	Gly	Ala	Pro	Arg
		35					40					45			
Ala	Asp	Pro	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Gly	Thr	Met	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu
	50					55					60				
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Pro	Arg	Val	Trp	Thr	Asp	Ala	Asn	Leu	Thr
65					70					75				80	
Ala	Arg	Gln	Arg	Asp	Pro	Glu	Asp	Ser	Gln	Arg	Thr	Asp	Glu	Gly	Asp
				85					90					95	
Asn	Arg	Val	Trp	Cys	His	Val	Cys	Glu	Arg	Glu	Asn	Thr	Phe	Glu	Cys
			100					105					110		
Gln	Asn	Pro	Arg	Arg	Cys	Lys	Trp	Thr	Glu	Pro	Tyr	Cys	Val	Ile	Ala
		115					120					125			

Ala	Val	Lys	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Phe	Met	Val	Ala	Lys	Gln	Cys	Ser
	130					135					140				
Ala	Gly	Cys	Ala	Ala	Met	Glu	Arg	Pro	Lys	Pro	Glu	Glu	Lys	Arg	Phe
145					150					155					160
Leu	Leu	Glu	Glu	Pro	Met	Pro	Phe	Phe	Tyr	Leu	Lys	Cys	Cys	Lys	Ile
				165					170					175	
Arg	Tyr	Cys	Asn	Leu	Glu	Gly	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Ser	Val	Phe	Lys
			180					185					190		
Glu	Tyr	Ala	Gly	Ser	Met	Gly	Glu	Ser	Cys	Gly	Gly	Leu	Trp	Leu	Ala
		195					200					205			
Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	
	210					215					220				

5 <210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia Artificial

<400> 39

cttaccatc tgccctcta

20

<210> 40

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

20 <400> 40

cctccattgg gaactgctac

20

<210> 41

<211> 24

25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 41

tcctgttgcc aggaagacct ctgc

24

30

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Secuencia Artificial

ES 2 379 413 T3

<400> 42
acttctgcc cagcagttac 20

<210> 43
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia Artificial

10 <400> 43
ggcactgacg ggtcttagt 20

<210> 44
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia Artificial
<400> 44
20 ctgccgcgcc tctgatgat 20

<210> 45
<211> 1659
<212> ADN
25 <213> mus musculus
<400> 45

```

ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agatacacag ccagtgatgt 60
ggaccaccgg atggctgttg ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctgg 120
agtgctacag ctgctgacag aaggcggacg atggatgctc tccgcacagg atgaagacag 180
tcaaagtgtg tcccgggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta gagaccatcc 240
acgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgacc 300
gcggactgga ccttcacggg ctctggcct tctttcagct acagcagtgc tccgaggacc 360
gatgcaacgc caaactcaac ctcaacttgc gaggcctcaa ccctgcagcg aatgagagtg 420
catatgagcc taacgggtgca gagtgtctaca gctgtgtggg tctgagccgc gagaagtgcc 480
agggctccat gccgcgggtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggtc 540
gcttcgatgg taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtcctta cctgtccgag 600
gctgctgcca ggacgagacc tgcacccggg atgggggtgac gggtcaggga ttcacactca 660
gcggctcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgcccacct tgcgaacaag acctatctct 720
cccctcgaat cccacccccta gtctgtgtgc cccctccaac caccgcagcc ccatccactc 780
gggcccagaa ctctccagc acgacctcta cagcagcccc aaccacgacc acctccatca 840
tcaagcccac cacagcccaa gccagccaca cttctcccca tgaatggat ctggaagtca 900
tacaggaaga gggggcgctg ttgagtggag gtgctgcggg ccatggaggt actgcgggcc 960
atggagggtgc tgcggggccac caagaccgca gcaatatgga gaagtatcca ggaaaggggtg 1020
gggcccagat cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtccctggtg tctgcagttc 1080
tgttgactgt ggttgctggc gcgatgctgt gaatgtctca tctcgaaaag tccatctcac 1140
tttgtttccc tggccccgtg gtaccaactc tttccatttc tcaactgact ggactggctc 1200
cgcccccatc cttcagcatt ctcaagtccg actgcactgg tttgcagctt cggaaaacag 1260
tctctgttg taaatattcc gctcgggtgg ccctactttt ttgatgcggc cacagcattc 1320
cccctgatgg tgaccaggac agaggggaaga gacgtctact ggctgagaga ggcccagaga 1380
gtccacggca agcctcctct tcccgttttc ctgaccaggc tggaagatga ccaggcaggt 1440
agacaatgga tccatcctcc gagcactgtg cttgcctggc acattgtgcg gaaatctggt 1500
cgcctgtctt ccttaggaga ctgtgaacaa ctctacaaca gggctctgtc tctggcctct 1560
ctatgtgttc tgtctggcac aggaaggtgt caataaagat ttagttactt tgtatagtga 1620
gttaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1659

```

30 <210> 46
<211> 363
<212> PRT
<213> mus musculus
<400> 46
35

Met Asp Ala Ala Arg Arg Gly Asp Thr Gln Pro Val Met Trp Thr Thr

ES 2 379 413 T3

```

1           5           10           15
Gly Trp Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Cys Glu Gly Ala Gln Ala
20
Leu Glu Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro
35
His Arg Met Lys Thr Val Lys Cys Gly Pro Gly Val Asp Val Cys Thr
50
Glu Ala Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Val Ala
65
Val Arg Gly Cys Gly Ser Gly Ile Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu
85
Asp Leu His Gly Leu Leu Ala Phe Phe Gln Leu Gln Gln Cys Ser Glu
100
Asp Arg Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Leu Arg Gly Leu Asn Pro
115
Ala Gly Asn Glu Ser Ala Tyr Glu Pro Asn Gly Ala Glu Cys Tyr Ser
130
Cys Val Gly Leu Ser Arg Glu Lys Cys Gln Gly Ser Met Pro Pro Val
145
Val Asn Cys Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp
165
Gly Asn Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val
180
Arg Gly Cys Val Gln Asp Glu Thr Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly
195
Pro Gly Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Pro Arg Cys Asn
210
Ala Asp Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu
225
Val Leu Leu Pro Pro Pro Thr Thr Ala Ala Pro Ser Thr Arg Ala Gln
245
Asn Ser Ser Ser Thr Thr Ser Thr Ala Ala Pro Thr Thr Thr Ser
260
Ile Ile Lys Pro Thr Thr Ala Gln Ala Ser His Thr Ser Pro His Glu
275
Met Asp Leu Glu Val Ile Gln Glu Glu Gly Ala Ser Leu Ser Gly Gly
290
Ala Ala Gly His Gly Gly Thr Ala Gly His Gly Gly Ala Ala Gly His
305
Gln Asp Arg Ser Asn Met Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Gly Ala Gln
325
Ile Pro Ala Lys Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ser Trp Leu Ser Ala
340
Val Leu Leu Thr Val Val Ala Gly Ala Met Leu
355
360

```

<210> 47

<211> 934

5 <212> ADN

<213> mus musculus

<400> 47

ES 2 379 413 T3

tcgctccccg cgccgtgccc gccgctgagc cgggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc 60
 gccccagagg acccccgcct gcagcccccg cgcctcttc aggcctatc ggagcatgct 120
 gcctgcagcc atgaagagcc tcggtctggc gctgctggcc ttgcttctct gccctcgc 180
 ggcccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt gcgctccgaa 240
 gcagtgccag cccaccgata ccgtttgtgc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcag 300
 caggaaggat cattctgtga acaagatgtg tgcttctcc tgcgacttcg ttaagcgga 360
 ctttttctca gactatctga tggggttcat taactctggg atcttaaaag tcgacgtgga 420
 ctgctgcgag aaagatttgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc cctgggcct 480

ggctgggggg ctctgctca gcctggggcc tgctcttctc tgggctgggc cctaagacc 540
 ctccctccct cctgctgggc tttggagctt gtcccctaag cctgttgctg cccctcccca 600
 gcctggcctg gctggggctg ggacagcaag ggtttggcat caaggtctga ggctctcaac 660
 ctccctagat gtgagtgagc cttctcogtt tctccaccag ctccatatcc caagcagctg 720
 aatatctcca ggagtccaga catcctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggc 780
 aagggactga gaccctccag gtctccaagg ggagggaggt caagccaggg acagcccaac 840
 agcctggcct gaggggcatt aactacagag aaataaagtc acttctgagt cttgtgaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 934

<210> 48
 <211> 160
 5 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 48

Met	Pro	Ala	Pro	Gln	Arg	Thr	Pro	Ala	Cys	Ser	Pro	Arg	Ala	Ser	Phe
1				5					10					15	
Arg	Pro	Tyr	Arg	Ser	Met	Leu	Pro	Ala	Ala	Met	Lys	Ser	Leu	Gly	Leu
			20					25					30		
Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Trp
		35					40					45			
Cys	Gln	Asp	Cys	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser	Ser	His	Cys	Ala	Pro	Lys	Gln
	50					55					60				
Cys	Gln	Pro	Thr	Asp	Thr	Val	Cys	Ala	Ser	Val	Arg	Ile	Thr	Asp	Pro
	65				70					75					80
Ser	Ser	Ser	Arg	Lys	Asp	His	Ser	Val	Asn	Lys	Met	Cys	Ala	Ser	Ser
			85						90					95	
Cys	Asp	Phe	Val	Lys	Arg	His	Phe	Phe	Ser	Asp	Tyr	Leu	Met	Gly	Phe
		100						105					110		
Ile	Asn	Ser	Gly	Ile	Leu	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Cys	Cys	Glu	Lys	Asp
		115					120					125			
Leu	Cys	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Gly	Arg	Ser	Pro	Trp	Ala	Leu	Ala
		130				135					140				
Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Trp	Ala	Gly	Pro
	145				150					155					160

10
 <210> 49
 <211> 2047
 <212> ADN
 <213> mus musculus
 15 <400> 49

ES 2 379 413 T3

```

agaagaggcg agactttttt gggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag 60
ccaactcctc cggaggcgct gcgctccgcc ccagggagcg cgaatccaag gagcctggga 120
ccagcctctg ggagccccg gcgcgggcga tgcggggccc gcggggcaca cctgcggctc 180
ctctcgggtg cagccgtcgc ttgggcgga gcagcgcgag cctcggcagc ctgcgagct 240
actgtgcgag cggccagaac agcctccgct gcggtcgtgg tctctgatgc tcttgcggc 300
tcccggccct gccgatccgg gaggatgtgg gtctcggca tcgcagcaac tttttgcgga 360
ttgttctggc ttccagggtt ggcgctgcaa attcagtgct accagtgatga agaattccag 420
ctgaacaacg attgctcacc ccctgagttc atcgtaaatt gcaccgtgaa cgttcaagac 480
atgtgtcaga aagaagtgat ggagcaaagt gctgggatca tgtaccgaa gtcgtgtgca 540
tcgtcagcag cctgtctcat tgctcagct gggtagcagt ccttctgttc ccctgggaaa 600
ctgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac acccctcttt gcaatgggcc gaggccaag 660
aagagaggca gctctgcctc ggccatcagg ccagggcttc tcaccactct cctgttcttc 720
cacttagccc tctgctggc acactgctga agctaaagga gatgccaacc cctgctgctc 780
cacctgtctg gcccttcgct tctcaccttc ccgagctctc tctgggtgtc cttttattct 840
gggtagacaa gggagtcttt ttgttccctc ctttcaagta acgcaagatt gccgtgcaca 900
aatacttttg taagctctga accaattcat tctgaatttc tgtgtgtagt tgaagaaaa 960
agcatggagc agaaagtcca gaccctccca tccaatctg gttaaccacc gccaaaggta 1020
gcctggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacgca tctgcctttc ccaaagcctt 1080

```

```

gagcttccat tctgtcccag taggagtcac agtctattca gagactgctg ctgctggaag 1140
gtaactttgc ttttgcggga ggggagagcc agtttcggct caaggcttct gaacttgcca 1200
ttcatacttc ctgctcctgt aaactathtt ctgggggtga cccagctggt ttggtctctg 1260
agccagctcg tggtagctca ggactcaagg gctggggctt agcctctcca ggcttggcct 1320
cagtctgaaa agtgcttaag aaaaccttgt tagttctcct ggaggaagag ttactgcgcc 1380
gggaggctag gaagatgagg gggctgcggg ctgagctggt gctgtccttg gtggagatga 1440
agcgggacag ctggcgcttc tcttggttgg catgctgcag agtcaggcgg cagcagagca 1500
cctgccagaa caccttccgg aactgctgag aggacacgtt gtagaggaga gggttgacca 1560
cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt 1620
acgttctggt ccagtcatgt ttgggttttg ctgcagccat gatccgtcgg atctgattgg 1680
gcatccaaca cacggccaac gtcaccacaa tcagtcctgg caggcaagaa caggagagaa 1740
aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa cccataaaat 1800
attaagcccc ttggttctgt tgcttactgg ccgagaaaac gtaccaatct ttcagctctg 1860
tgcttgtcgg cttctttttg ccaactggcaa aggagaattt aatgctgctt caagctcagg 1920
ggacttggct atgttaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtatttata cttacggctg 1980
cctgttaatt ttcaaaatgt tttcattggt gctcgtgtat ccagaaaata tctcacgctg 2040
gcaaaaa 2047

```

- <210> 50
- <211> 141
- 5 <212> PRT
- <213> mus musculus
- <400> 50

```

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Trp Leu
 1          5          10
Pro Gly Leu Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu Phe Gln
          20          25          30
Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn Cys Thr Val
          35          40          45
Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu Gln Ser Ala Gly
          50          55          60
Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala Ala Cys Leu Ile Ala
          65          70          75          80
Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val
          85          90          95
Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys
          100          105          110
Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Ile Arg Pro Gly Leu Leu Thr Thr
          115          120          125
Leu Leu Phe Phe His Leu Ala Leu Cys Leu Ala His Cys
          130          135          140

```

- 10
- <210> 51
- <211> 516
- <212> ADN

ES 2 379 413 T3

<213> mus musculus
<400> 51

```

ggcaggcctg agtgaggacc tgcaccatgc aggggacctg gatggtgctg ttggcactga 60
tattgggcac cttcggggag cttgctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaatcctg 120
tgagtgcata caactgtgtc accaccaccc actgccacat caatgaaacc atgtgcaaga 180
ctacgctcta ctccctggag attgttttcc ctttcctggg ggactccacg gtgaccaagt 240
cctgcgccag caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgt 300
cctgctgcaa ttctgaccta tgcaacgtgg atggggcacc cagcctgggc agtcctggtg 360
gcctgctcct tgccctggca cttttcttgc tcttgggtgt cctgctgtaa agccatggcc 420
atctagctcc actcccttgt ccctgacatc ccagttccct aatgcctaga agaaatacaa 480
tggccatctg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 516
    
```

5

<210> 52
<211> 127
<212> PRT
<213> mus musculus

10 <400> 52

```

Met Gln Gly Thr Trp Met Val Leu Leu Ala Leu Ile Leu Gly Thr Phe
 1           5           10           15
Gly Glu Leu Ala Met Ala Leu Gln Cys Tyr Thr Cys Ala Asn Pro Val
      20           25           30
Ser Ala Ser Asn Cys Val Thr Thr Thr His Cys His Ile Asn Glu Thr
      35           40           45
Met Cys Lys Thr Thr Leu Tyr Ser Leu Glu Ile Val Phe Pro Phe Leu
      50           55           60
Gly Asp Ser Thr Val Thr Lys Ser Cys Ala Ser Lys Cys Glu Pro Ser
      65           70           75           80
Asp Val Asp Gly Ile Gly Gln Thr Arg Pro Val Ser Cys Cys Asn Ser
      85           90           95
Asp Leu Cys Asn Val Asp Gly Ala Pro Ser Leu Gly Ser Pro Gly Gly
      100          105          110
Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Leu Gly Val Leu Leu
      115          120          125
    
```

<210> 53
15 <211> 450
<212> ADN
<213> mus musculus
<400> 53

```

atgcttttta tggcaggccc tgcagccagc tggtccttga ggcccctggg actccatggc 60
gtcccccagg ccttgtgtgc tgtcctctta acagtgtctg tcatgaagac cttggttctc 120
ggtgatacca agctcgagga ccttcaccct cagtcctctc cactaaacaa gtacctgaat 180
tgctaccgat gtctgctgga gaccgaagag ctgggggtgc tcctggggtc tgacacctgc 240
ctgacacctc tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggttttaat 300
gtcatggtga gcgactgcta cagcaaggag cagatggtcc attgttcata taccctgtct 360
tccccggtgt ttggcttttg gatattctat cagtgttgct tcctggattt ctgcaacaat 420
ccggacaaca gaaagaatag catgcactag 450
    
```

20

<210> 54
<211> 149
<212> PRT
25 <213> mus musculus
<400> 54

ES 2 379 413 T3

Met Leu Phe Met Ala Gly Pro Ala Ala Ser Trp Ser Leu Arg Pro Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu His Gly Val Pro Gln Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Thr Val
 20 25 30
 Leu Val Met Lys Thr Leu Val Leu Gly Asp Thr Lys Leu Glu Asp Leu
 35 40 45
 His Pro Gln Ser Leu Pro Leu Asn Lys Tyr Leu Asn Cys Tyr Arg Cys
 50 55 60
 Leu Leu Glu Thr Glu Glu Leu Gly Cys Leu Leu Gly Ser Asp Thr Cys
 65 70 75 80
 Leu Thr Pro Leu Gly Ser Ser Cys Val Thr Leu His Ile Lys Asn Ser
 85 90 95
 Ser Gly Phe Asn Val Met Val Ser Asp Cys Tyr Ser Lys Glu Gln Met
 100 105 110
 Val His Cys Ser Tyr Thr Arg Ala Ser Pro Val Phe Gly Phe Trp Ile
 115 120 125
 Phe Tyr Gln Cys Cys Phe Leu Asp Phe Cys Asn Asn Pro Asp Asn Arg

130 135 140
 Lys Asn Ser Met His
 145

- <210> 55
- 5 <211> 960
- <212> ADN
- <213> mus musculus
- <400> 55

agagctggag acctgggaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgtggacatt ctcaggaccc 60
 tcaccatgaa acacctcctg ttgctcacc tgtctgcct actctactgc tgggtctcag 120
 ctgatactcg atgtcactcc tgctacaaag tccctgtgct gggctgtgtg gatcgccagt 180
 cctgccgcct ggagccgggc cacaatgccc tgacaacaaa cgtgtacctt gggaagatgt 240
 gggttttctc taacctgctc tgccggcacac cagaagagcc ttgtcgggag gtcttcaacg 300
 aaaccaacca taagctgggc ctgaactaca acaccacctg ctgtgacaag gataactgta 360
 acagcccggc tccacggccc acaccggcac tggcctcat ctccctcacc tccttggctg 420
 gcctcggcct ctggttattg cattgagact agctccatgg ctacaatctt accactgct 480
 atagcctgag ctttctccc tgtgtctca gagctccagc tttccagaat cttctctcct 540
 cccaccccct tcttctgaag atcatgtccc tagtctata ccatttattt catgggactg 600
 tacctggagt ggcctttcta gccaccgctc ctctccctca cttgtcacct tccactccat 660
 tccacccaca cacagacaca cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacaca 720
 cacacacaca cccagtcctt tcccatttcc ttctagaaca ctctacctcc tccactggcc 780
 actgaaaggc tcccctcctt ggacgcacac tgctgtgcct ctgggatcta agtctggaag 840
 aactcctgtc ttgtctccag ggagtgattc caaaaggcgc tggcctcatt gcatgggcct 900
 ggcttaccag accctctgct tgtccccttc tatcttgaga aataaacatc agtgtcta 960

- 10
- <210> 56
- <211> 126
- <212> PRT
- 15 <213> mus musculus
- <400> 56

ES 2 379 413 T3

Met	Lys	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Tyr	Cys	Trp
1			5						10					15	
Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Arg	Cys	His	Ser	Cys	Tyr	Lys	Val	Pro	Val	Leu
			20					25					30		
Gly	Cys	Val	Asp	Arg	Gln	Ser	Cys	Arg	Leu	Glu	Pro	Gly	His	Lys	Cys
		35					40					45			
Leu	Thr	Thr	Asn	Val	Tyr	Leu	Gly	Lys	Met	Trp	Val	Phe	Ser	Asn	Leu
	50					55					60				
Arg	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Glu	Pro	Cys	Arg	Glu	Val	Phe	Asn	Glu	Thr
65					70					75					80
Asn	His	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Cys	Cys	Asp	Lys	Asp
				85					90					95	
Asn	Cys	Asn	Ser	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Thr	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile
			100					105					110		
Ser	Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Leu	Trp	Leu	Leu	His		
		115					120					125			

<210> 57

<211> 3952

5 <212> ADN

<213> mus musculus

<400> 57

gcctacttgg cctgcctgcg atgcggtacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca 60
 gttagacagc aggagggacc tgggagcggc caggggatg ttttatctct aagagaccaa 120

ES 2 379 413 T3

gagctcaggc agggcttctg tgcctgctt cctccctggc ttgagctgga tcctggacca 180
gctgctgacc tcctgttcac tctggcactg ccctcacgtc tccgctatga cccatctgct 240
cacagtgttc ctgggtggcc tgatgggctt gctgtggcc caggctctgg agtgccacgt 300
gtgtgcctac aatggagaca actgcttcaa acccatgctg tgcccagcca tggccaccta 360
ctgtatgacc acacgaactt acttcacccc ataccggatg aaggtgagga agtcctgtgt 420
ccccagctgc tttgaaaccg tgtacgatgg ctattccaag catgcatctg ccacctctg 480
ttgccagtac tacctctgca acgggtgctgg ctttgctacc ccggtgacct tggccttgg 540
cccagcactc ctagctacct tctggagctt gctgtaaagc tcggttcccc aagccagatc 600
cactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctcccaat tcaactcacc 660
caacgctctt ccttctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaaag 720
aactgatggc atccagatac ctcaactcaa ggtcattttc agaaggctga catgtggacc 780
tgtaatgtgc ccacccatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctacca agatcagggg 840
catctgggag aatgtttatg gaggaggggt catcactcaa gtcaaggagc actgatttga 900
tagaattagt agccaaactc caccttcaga accctgcctc agtctacca gttagaggatg 960
ggctctgctag aggtgagggg aggagagcgg cggagaataa cgagctggct agaagcagag 1020
aaagactcag cagggctgtc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa atgtgatgtg 1080
gaagccatgt gaggaagccc tttgtcattt ccacttatct gaggaactct gccagacctg 1140
atgttgggat agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcatttcca taggacctg 1200
aaatccctcc agccccagct cagcaggccc cttgacctcc actacagtcc tcattcaca 1260
caccagctgc tggccttga agttggcagg gacttgggag caggtgacct atgctatttt 1320
ttgtctggcc tgttattctg ggcattggcaa gaaggatca gacgcaggtc agagcagggc 1380
agttagggca ctgagacagg gaaacagact tcagccagtg gcttcccagg tcccgtaggc 1440
agctcctaca tccttcagtc tcttgttaca ttcccgggag acaaatatac aggggaccaa 1500
gccagatgct aggtgatgac tgcctgtgaa gtctattgtg gccacagact gctgggtacc 1560
aagtctcagg agaaccagc ctgatttag gagacacaga tctgccttcc atgcagtgtg 1620
gctgtccttg ggagccttac catgctctct aactagtacc tcaactcaca tgtcactgag 1680
gaacccccca aactggccc agcccagggg tcgggatgct ggccaatgtc catggagtgg 1740
gactaccat ggagagtcct tgggtcatca catcacaagt gttttattcc aacccccag 1800
tggtgagagc tcgggacaca aaggtccatc ctggggacct tcttctggt tctaggcaga 1860
cctgaactct gtctgctgct agagctgatg tggttttccg cctcagtttc ctctccggg 1920
gataggccac cggaggattt gggagggtgg ggaggcatc ctgctgatgg gctcggcag 1980
gcttctcagga acaggaacgg gcggggcttt agtacacagg tgagtgggt gggaaactggc 2040
ctggagctga ggagacactg actgggcaga gggaaagatga gtctcaagg aggcaaggaa 2100
aagggagggg gagcgcgcat gcacatgtgc actcagtga ggctacagag cccaaaaggc 2160
agcactggct gtgtgtccc ctgaggcca ggcaagatgc taggaggaag ccaatgctgc 2220
ccccacctga gctcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag cattgagact 2280
gacctgtgga cgccataggg cactggcaag gagggtcaga ggcgggtccc tgactcagt 2340
ggtagtgccc gggaacatt atcctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccag 2400
agatggcgct ctcaaccaa actgagagga gccccagtc aggtcctccc tcctaccaca 2460
aggggggtgt gtggaggagg cttgattgcc cttggagaag caccggtact gcagagctgg 2520
gggcccagct ctttcatctg tgtctagaca ccgaccagat aggccccaca gtggcaacac 2580
tgccacacag ccctacaaga agccctgtgc ctgctagca cagagcccca aaaggtgctc 2640
aattaatata gggccaagcc tgccagtggg ggggatgagc attaggggaa cagaccaga 2700
tggcctgtcc tgaaccctgt ctgggggtgt gtgatgagca tctgtctagc ccactgagg 2760
tggtcttaca cactccacaa cagttctgca aaagtgtatg agtgggtcat tactgcgcc 2820
ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgaggc acttcatttt cctgggcat 2880
tcaactttcc aggaccaaca cattcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttcttt 2940
gagctggggc ccctgaaga tgatagtggc ttcataacc agagaatttc agagtgcagt 3000
gtttagggc cctatgaacc tgaatgtca gaactggagg tttgagggg tgaggggtag 3060
gccaggggtg tctggccct tgtgtggaga cagagagaga gggaaactgg gatggggtag 3120
tagagagaag tgcaaggag cgtcagcctt tctcagggct aatgctgtca gggacgagg 3180
ctcaagcctg tgagtgttct cacactgtga taaacagtgg ccctcaaca cagacggtgt 3240
ccagagtggc cggcagtgg tctctagagt tgcaatctgg aagcctctt gtagtactg 3300
gagagaggcc gctttaggg acagcaccaa atgtgtgtgc tctgtggga tgtgaggaag 3360
ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtcct tcagagcaga ggggtggctg gtctagtcca 3420
ccagagacaa gctatccagt gagagtcata ctctgcacc gtctctgtga ttacctacc 3480
ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtct catcttctgc ggcaagcac 3540
tgatgtcaca tctgaaact ctgaaagat ttccaggagt ggggtgtgct tttgcttgg 3600
tgcatgtgta cttctggca agcaccgtgg catcccagc actgagtga cctgggctcc 3660
tcaagccatc tcattggtga aatgacagt ccagtacct ctcagctggc tcttgaggc 3720
ctgtgcatgg ggtctgcaca gaggaggccc ccaaactatg catggacgga cacgtgatg 3780

ctagcacttc cettggtgt gtctctgcca acccaggt ctcaccagc aaggaatga 3840
aatccacttt tatgacacat ctccctccc cagccagct cattcaccta tatgccagg 3900
tggtccttt caatgtctgt cccccattgg atgaataaac aagcgaagga ca 3952

<210> 58
5 <211> 116

ES 2 379 413 T3

<212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 58

Met	Thr	His	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Gly	Leu	Pro
1				5					10					15	
Val	Ala	Gln	Ala	Leu	Glu	Cys	His	Val	Cys	Ala	Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn
			20					25					30		
Cys	Phe	Lys	Pro	Met	Arg	Cys	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	Tyr	Cys	Met	Thr
		35					40					45			
Thr	Arg	Thr	Tyr	Phe	Thr	Pro	Tyr	Arg	Met	Lys	Val	Arg	Lys	Ser	Cys
	50					55					60				
Val	Pro	Ser	Cys	Phe	Glu	Thr	Val	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Ser	Lys	His	Ala
65					70					75					80
Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Cys	Gln	Tyr	Tyr	Leu	Cys	Asn	Gly	Ala	Gly	Phe
				85					90					95	
Ala	Thr	Pro	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Phe
			100					105					110		
Trp	Ser	Leu	Leu												
			115												

5

<210> 59
 <211> 20
 <212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Secuencia Artificial
 <400> 59

catgatcctc cgaatctggt 20

15

<210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 60
 agcacagaac agaggggcta 20

25

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

30 <223> Secuencia Artificial
 <400> 61

atcggccaa tgtcacaaca 20

35

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 62
 acttctgtt cccaccactg 20

45

<210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 63
 agaggacaag cggagagaca 20

ES 2 379 413 T3

	<210> 64		
	<211> 20		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia Artificial		
	<400> 64		
	ttctggcagg ggtgttctag	20	
10	<210> 65		
	<211> 18		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia Artificial		
	<400> 65		
	agcagcagca ggaaggat	18	
20	<210> 66		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
25	<223> Secuencia Artificial		
	<400> 66		
	aaaagtgccg ctaaacgaag	20	
30	<210> 67		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia Artificial		
35	<400> 67		
	caagatgtgt gcttcctct cga	24	
40	<210> 68		
	<211> 2798		
	<212> ADN		
	<213> Homo Sapiens		
	<400> 68		

ES 2 379 413 T3

cgttgctgtc	gctctgcacg	cacctatgtg	gaaactaaag	cccagagaga	aagtctgact	60
tgccccacag	ccagtgagtg	actgcagcag	caccagaatc	tggtctgttt	cctgtttggc	120
tcttctacca	ctacggcttg	ggatctcggg	catggtggct	ttgccaatgg	tccttgtttt	180
gctgctggtc	ctgagcagag	gtgagagtga	attggacgcc	aagatcccat	ccacagggga	240
tgccacagaa	tggcggaatc	ctcacctgtc	catgctgggg	tcctgccagc	cagccccctc	300
ctgccagaag	tgcacacctc	cacaccccag	ctgtgcatgg	tgcaagcaac	tgaacttcac	360
cgcgctggga	gaggcggagg	cgcgggcgtg	cgcccagcga	gaggagctgc	tggctcgagg	420
ctgcccgtg	gaggagctgg	aggagccccg	cggccagcag	gaggtgctgc	aggaccagcc	480
gctcagccag	ggcgccccgcg	gagaggggtg	cacccagctg	gcgccgcagc	gggtccgggt	540
cacgtgagg	cctggggagc	cccagcagct	ccaggtccgc	ttccttcgtg	ctgagggata	600
cccgttccat	ctgtactacc	ttatggacct	gagctactcc	atgaaggacg	acctggaacg	660
cgctcgccag	ctcgggcacg	ctctgctggt	ccggctgcag	gaagtcaccc	attctgtgcg	720
cattggtttt	ggttcctttg	tggacaaaac	ggtgctgccc	tttgtgagca	cagtaccctc	780
caaactgctg	cacccctgcc	ccacccggct	ggagcgctgc	cagtcacat	tcagctttca	840
ccatgtgctg	tccctgacgg	gggacgcaca	agccttcgag	cgggaggtgg	ggcgccagag	900
tgtgtccggc	aatctggact	cgctgaagg	tggttcgat	gccattctgc	aggctgcact	960
ctgccaggag	cgattggct	ggagaaatgt	gtcccggctg	ctggtgttca	cttcagacga	1020
cacattccat	acagctgggg	acgggaagtt	ggcgccatt	ttcatgccca	gtgatgggca	1080
ctgccacttg	gacagcaatg	gcctctacag	tcgcagcaca	gagtttgact	acccttctgt	1140
gggtcaggta	gcccaggccc	tctctgcagc	aaatatccag	cccatctttg	ctgtcaccag	1200
tgccgcactg	cctgtctacc	aggagctgag	taaactgatt	cctaagtctg	cagttgggga	1260
gctgagtgag	gactccagca	acgtggtaca	gctcatcatg	gatgcttata	atagcctgtc	1320
ttccaccgtg	acccttgaac	actcttcact	ccctcctggg	gtccacattt	cttacgaate	1380
ccagtgtgag	ggtcctgaga	agagggaggg	taaggctgag	gatcgaggac	agtgaacca	1440
cgctccgaatc	aaccagacgg	tgactttctg	ggtttctctc	caagccacc	actgcctccc	1500
agagccccat	ctcctgaggc	tccgggccct	tggttctca	gaggagctga	ttgtggagtt	1560
gcacacgctg	tgtgactgta	attgcagtga	cacccagccc	caggctcccc	actgcagtga	1620
tgccagggga	cacctacaat	gtggtgtatg	cagctgtgcc	cctggccgcc	taggtcggct	1680
ctgtgagtgc	tctgtggcag	agctgtcctc	cccagacctg	gaatctgggt	gcccgggctcc	1740
caatggcaca	gggcccctgt	gcagtggaaa	gggtcactgt	caatgtggac	gctgcagctg	1800
cagtggacag	agctctgggc	atctgtgcga	gtgtgacgat	gccagctgtg	agcgacatga	1860
gggcatcctc	tgcgagggct	ttggtcgctg	ccaatgtgga	gtatgtcact	gtcatgccaa	1920
ccgcacgggc	agagcatgcg	aatgcagtgg	ggacatggac	agttgcatca	gtcccagggg	1980
agggtctg	agtgggatg	gacgctgcaa	atgcaaccgc	tgccagtgtc	tggacggcta	2040
ctatggtgct	ctatgcgacc	aatgcccagg	ctgcaagaca	ccatgcgaga	gacaccggga	2100
ctgtgcagag	tgtggggcct	tcaggactgg	cccactggcc	accaactgca	gtacagcttg	2160
tgccataacc	aatgtgacc	tggccttggc	ccctatcttg	gatgatggct	ggtgcaaaga	2220
gcggaccctg	gacaaccagc	tgttcttctt	cttgggtggag	gatgacgcca	gaggcacggt	2280
cggtgctcaga	gtgagacccc	aagaaaaggg	agcagaccac	acgcaggcca	ttgtgctggg	2340
ctgctgagg	ggcatcgtgg	cagtggggct	ggggctggtc	ctggcttacc	ggctctcggg	2400
ggaaatctat	gaccgcccgg	aatacagtcg	ctttgagaag	gagcagcaac	aactcaactg	2460
gaagcaggac	agtaatcctc	tctacaaaag	tgcatcacg	accacatca	atcctcgctt	2520
tcaagaggca	gacagtccca	ctctctgaag	gagggaggga	cacttaccca	aggctcttct	2580
ccttgaggga	cagtgggaac	tggaggggtga	gaggaagggt	gggtctgtaa	gaccttggtg	2640
ggggactaat	tcactggcga	ggtgcgggcca	ccacctaact	tcattttcag	agtgcacccc	2700
aagagggctg	cttcccatgc	ctgcaacctt	gcatccatct	gggctacccc	accacagtat	2760
acaataaagt	cttacctcag	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			2798

- <210> 69
- <211> 798
- 5 <212> PRT
- <213> Homo Sapiens
- <400> 69

ES 2 379 413 T3

Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ser Arg
1 5 10 15
Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr
20 25 30
Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala
35 40 45
Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys
50 55 60
Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys
65 70 75 80
Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu
85 90 95
Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser
100 105 110
Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val
115 120 125
Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe
130 135 140
Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu
145 150 155 160
Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His
165 170 175
Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly
180 185 190
Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val
195 200 205
Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln
210 215 220
Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln
225 230 235 240
Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp
245 250 255
Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln
260 265 270
Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser
275 280 285
Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe
290 295 300
Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser
305 310 315
Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala
325 330 335
Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala
340 345 350
Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val
355 360 365
Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp
370 375 380
Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu
385 390 395 400
Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu
405 410 415
Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg
420 425 430
Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys
435 440 445
Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu

ES 2 379 413 T3

	450					455						460			
Glu	Leu	Ile	Val	Glu	Leu	His	Thr	Leu	Cys	Asp	Cys	Asn	Cys	Ser	Asp
465					470					475					480
Thr	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	His	Cys	Ser	Asp	Gly	Gln	Gly	His	Leu	Gln
				485					490					495	
Cys	Gly	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Leu	Cys	Glu
			500					505					510		
Cys	Ser	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Asp	Leu	Glu	Ser	Gly	Cys	Arg
		515					520					525			
Ala	Pro	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Gly	His	Cys	Gln
	530					535					540				
Cys	Gly	Arg	Cys	Ser	Cys	Ser	Gly	Gln	Ser	Ser	Gly	His	Leu	Cys	Glu
545					550					555					560
Cys	Asp	Asp	Ala	Ser	Cys	Glu	Arg	His	Glu	Gly	Ile	Leu	Cys	Gly	Gly
				565					570					575	
Phe	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	His	Cys	His	Ala	Asn	Arg	Thr
			580					585					590		
Gly	Arg	Ala	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly	Asp	Met	Asp	Ser	Cys	Ile	Ser	Pro
		595					600					605			
Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	Ser	Gly	His	Gly	Arg	Cys	Lys	Cys	Asn	Arg	Cys
610						615					620				
Gln	Cys	Leu	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Leu	Cys	Asp	Gln	Cys	Pro	Gly
625					630					635					640
Cys	Lys	Thr	Pro	Cys	Glu	Arg	His	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Cys	Gly	Ala
				645					650					655	
Phe	Arg	Thr	Gly	Pro	Leu	Ala	Thr	Asn	Cys	Ser	Thr	Ala	Cys	Ala	His
			660					665					670		
Thr	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	Trp	Cys
		675					680					685			
Lys	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asn	Gln	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Asp
690					695					700					
Asp	Ala	Arg	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Pro	Gln	Glu	Lys	Gly
705					710					715					720
Ala	Asp	His	Thr	Gln	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Cys	Val	Gly	Gly	Ile	Val
				725					730					735	
Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Tyr	Arg	Leu	Ser	Val	Glu	Ile
			740					745					750		
Tyr	Asp	Arg	Arg	Glu	Tyr	Ser	Arg	Phe	Glu	Lys	Glu	Gln	Gln	Gln	Leu
	755						760						765		
Asn	Trp	Lys	Gln	Asp	Ser	Asn	Pro	Leu	Tyr	Lys	Ser	Ala	Ile	Thr	Thr
770						775					780				
Thr	Ile	Asn	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu	Ala	Asp	Ser	Pro	Thr	Leu		
785					790						795				

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido LY6 (a) en una muestra de ensayo de tejido inflamado o células obtenidas del tracto gastrointestinal de dicho mamífero, y (b) en una muestra del control, en la que un nivel de expresión mayor del ácido nucleico o polipéptido LY6 en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra del control, es indicadora de la presencia de IBD en el mamífero a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tejido o las células de la muestra de ensayo son del colon del mamífero.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tejido o las células de la muestra de ensayo son del íleo terminal del mamífero.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra del control es una muestra de un tejido o células normales sin IBD del mismo origen o tipo de tejido, o múltiples muestras de tejido o células sin IBD del mismo origen o tipo de tejido, los niveles de expresión del cual están promediados, o un control universal que representa la expresión del gen en múltiples muestras de tejido normal sano de la misma especie.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
(a) poner en contacto la muestra de ensayo con un agente detectable que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido LY6 o uno de sus fragmentos; (b) poner en contacto la muestra del control con el agente detectable; y (c) detectar la formación de un complejo entre el agente y el polinucleótido de la muestra de ensayo y la muestra del control, en el que la formación de menos complejo en la muestra de ensayo con respecto a la muestra del control es indicadora de la presencia de IBD en el mamífero; en el que opcionalmente, el procedimiento es el ensayo de hibridación in situ o el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, 6, o uno de sus fragmentos que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, o 6.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el agente es un segundo polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, 6 o su complemento.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el segundo polinucleótido comprende una marca detectable o unida a un soporte sólido, en el que la marca detectable es directamente detectable o indirectamente detectable, y opcionalmente, en el que la marca detectable es una marca fluorescente.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
(a) poner en contacto la muestra de ensayo con un agente detectable que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido LY6 o uno de sus fragmentos; (b) poner en contacto la muestra del control con el agente detectable; y (c) detectar la formación de un complejo entre el agente y el polinucleótido de la muestra de ensayo y la muestra del control, en el que la formación de menos complejo en la muestra de ensayo con respecto a la muestra del control es indicadora de la presencia de IBD en el mamífero.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el polipéptido LY6 comprende la SEQ ID NO: 10, 2, 5 o 7 o uno de sus fragmentos que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 10, 2, 5 o 7.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el agente es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión, en el que opcionalmente el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión comprende una marca detectable, en el que la marca detectable es directamente detectable o indirectamente detectable, y en el que opcionalmente la marca detectable es una marca o una radiomarca fluorescente.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, la reivindicación 5 o la reivindicación 9, en el que la muestra de ensayo de tejido o células es de un mamífero sospechoso de experimentar IBD.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, la reivindicación 5, o la reivindicación 9, en el que la muestra de ensayo de tejido o células es de un mamífero sospechoso de experimentar UC.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, la reivindicación 5, o la reivindicación 9, en el que los tejidos o las células del mamífero se han puesto en contacto con un agente terapéutico, y en el que el nivel de expresión de LY6 es indicador de la presencia o ausencia de una respuesta al agente terapéutico en el tejido o las células del mamífero.

15. El procedimiento de la reivindicación 1, la reivindicación 5, o la reivindicación 9, en el que los tejidos o las células del mamífero se han puesto en contacto con un agente terapéutico, en el que la detección es una detección segunda o posterior, y en el que el nivel de expresión de LY6 es indicador de la presencia o ausencia de una respuesta al agente terapéutico en el tejido o las células del mamífero.

5

16. El procedimiento de la reivindicación 1, la reivindicación 5, o la reivindicación 9, en el que el aumento en la expresión de LY6 en la muestra de ensayo es al menos de 1,5 veces, al menos de 2 veces, al menos de 3 veces, al menos de 5 veces, al menos de 6 veces, al menos de 7 veces, al menos de 8 veces, al menos de 9 veces, o al menos de 10 veces más que la muestra del control.

10

cgcgtctcggctcgttccccgaaagacgaggctcgcgccggattccgggtccgcagggagaccgaagggcacagctccccgcgccg
cgcacgccgcccagcccggagtcgggacacccccgggatgcttcgccccagaggaccgcgccccagccccgcgccgcccc
aggcccacccggagcatgctgcctcagccatgaagggcctcggcctggcgtcctgctgtgctcggcggccgcicagtg
cctgtggtgccaggactgcaccctgaccaccaactccagccattgcaccccaagcagtgccagccgtccgacacggtgtgtgccagtgt
ccgaalcaccgatcccagcagcagcaggaaggatcactcggcgaacaagatgtgtccctcctctgtgacttcgttaagcgacacttttctc
agactatctgatggggttttaactctgggatcctaaaggcgcagctggactgcgcgagaaggattgtgcaatggggcggcagggggcag
ggcacagccccgggcccctgcccggggggctcctgctcagcctggggcctgccctcctctgggctgggcccctgatgtcctccttcca
cggggcttctgagcttgcctcccctgagcctgtggctgccctcctcccagcctggcgtggctggggctggggggcagccttggcccagctcc
gtggctgtgctgtggctcctcctcctcccagcgtgaagcctcctgtctcctccagctctgagcccagggcagctggacatctcca
ggaaaccaggccatctgggcaggaggcctggggatgagggtggggggggacccccagggtcccggaggggaagtgaagcaacagcc
cagctggaagggcgtctctcggag aaataaagtcacttttgagctctgagaaaaaaaaa

Figura 1A

ES 2 379 413 T3

MLPAAMKGLGLALLAVLLCSAPAHGLWCQDCTLTTNSSHCTPKQCQPSDTVCASVRIT
DPSSSRKDHSVNKMCASSCDFVKRHHFSDYLMGFINSILKVDVDCCEKDLNKAAGA
GHSPWALAGLLLSLGPALLWAGP

Figura 1B

agggcgggtg caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcggcccg ggcaagtgag acagttaagg
 cagtgtcccc accacacccc caccagat ggccacgccg agctgggttc tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg
 gcacagctgc acaggacacc ctacggagcc tgcgggcgtg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ccttctgtc
 agcctcccgg ggcgccaggc tcccgcggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggtt ggaccagtc gctgggtac
 cgaccagtc tggaaagcgc agagagcgtg gagtggggag gctgccttc tatgtcgaa gggccagccg ggcacgagt
 cctcagacc tagtccgac cggcaggtc cccacggcac ctgctgcgcc ctctcgccg ccccccaac cccccatc
 cagaaaacta ceagttctc cccgcccc ggcgcccc tcccaggaac gtgcggaggc gggagaagag gaagacagga
 aggggggtgg gatgtgaagc gacctcca gcctcccc cccgccacc ccaccaac tccgagccg tcacgtgat
 cctggagtgg gagggtggga gaaaaggcga gactttgtg ggtgctccc atcgccagta gttcctcag ttcacggc
 caactccgga ggcgcggtgc tggccccgg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag cgggagccc gagcgcggc
 gatcaggtc cgcgagcgg cacctgcggc tctctaagc tacgaccgtc gtcgccgg cagcagcgc ggcaccagca
 gccctggcag ccacagcgc tgcagcggg gcagcctccg ctgctgtgc ctctctgat gcgcttccc tccccggc
 cgggaccc gggagaatgt gggctctagg cctgcggca acttttgc gattgtct gctccaggc ttgctgtc
 aaatccagt ctaccagt gaagaattc agtgaaca cgactgtcc tccccgagt tcaatgtga ttgcaggtg
 aacgtcaag acatgtgca gaaagaagt atggagcaaa gtccgggat catgtacc aagtctgt catcatcag
 gccctgtc atgcctct cgggtacca gctctctgc tcccaggga aactgaact agttgcac agctgtgca
 acaccctc ttgtaacgg ccaaggcca agaaaagg gaggcttgc tggccctca ggcagggt cgcaccacc
 atctgttc tcaattagc cctctctc gcacatgt gaagctgaag gagatgcc cccctctc attgttct cagcctgc
 ccccaacc caccctct gattgagtt ctctgggt tctttat ctggtaggg agcgggagc cgtgtctc ttgtctc
 tgaataat gaaagagtc ggtaaagcat tctgaataa tccagctga ctgaatttc agtatgact tgaaggaag
 aggtggagt aaagtcacc cccatgtct tgaaccgga gcaaggcca ggctggcaga gtcagctct agaagtcact
 gagggtggca tctgcttt gtaagcctc cagtgtcc tccatcct atggggcat agttgagac tgcagagtga
 gattgagtt ttctaggc tggaggcca gttccact aaggctct cgttgacat tcaaatca tctctgaa aaccattc
 tgcagcaga ttgctggt tgcgctga gttggctc agtgactga gactcaatga ctggacta gactgggt
 cggctcgt ctgaaaagt ctaagaaaa tctctcagt tctctgca gaggactgg gccgggacg gaagagcaac
 gggcgtgca caaacgggc gctgtggg tggagtgcg catgtacgc cagcgcctc tctgtgtgg cgtgtgag
 cgacaggg cagcacgca cctgcagaa caccgcca aactgtgc aggacacc gtacaggag ggttgatga
 ccgagctgag gtgaaaaac gtcctcaga aggggagg gatcatgtac gcccggaagt aggacctgt ccagctgtc
 ttgggtgg ccgagccat gatctcga atcgtgtg gcatccagca tacggccat gtcacaaca tccacctg
 gcagacagca gcaggagga gagacagaga aaagaaaa acagcatgag aacacagta atgaataaaa ccaataata
 tttagccct ctgtctgt ctactggc aggaaatgt accaatttt cagtgtgga ctgacagct tctttgca caagcaag
 agaattaac actgttcaa acccgggg gttggctgt taaagaaag accallaat gcttagaca gtgtattat accagttat
 gctgtaat ttaaaaaa tttttcatt ggtgtgtt tgcgtatca gaaagcagt calgtatcc ata

Figura 2A

gatgcctgga gtgggagggtg gggagaaaag gcgagacttt tgggggtgct cccgatcgcc agtagttcct tcagtcicag
ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcggcc cgggagcgcg agcgggagga gcagagacc gcagccggga gcccgagcgc
gggcgatgca ggclccgca gggcacctg cggctccict aagctacgac cgtcgtctcc gcggcagcag cgcgggcccc
agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgctctc tcagtcgctt gccctctccc
ggccccggga clccgggaga atgtgggicc taggcatcgc ggcaactttt tgcggattgt tcttgcctcc aggctttgcg
ctgcaaatcc agtctacca gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctcccc gagttcattg tgaattgcac
ggtgaacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgatggag caaagtgccg ggatcatgta ccgcaagtc tctgcatcat
cagcggcctg tctatcgcc tctgcccgtt accagctctt ctgctccca gggaaactga actcagtttg cactcagctg
tgcaacacc cttttgtaa cgggccaagg ccaagaaaa ggggaagttc tgcctcggcc ctgagccag ggtccgcac
caccatctg tctcaaat tagcctctt ctggcacac tctgaagct gaaggagatg ccacccctc ctgattgtt ctccagccc
tcgccccaa cccccacct cctgagtga gtttctctg ggtctctt tattctgggt agggagcggg agtccgtgt cttttgtt
cctgicaaa laatgaaaga gctcggtaaa gcattctgaa taaatcagc ctgactgaat ttccagtat tacttgaagg
aaggaggtg agtgaagtt caccctcatg tctgtaac cggagtcaag gccaggctgg cagagtcagt cctagaagt
cactgagtg ggcactgccc tttgtaaag ctccagctt ccatccalc cctgagggg gcatagttg agactgcaga
gtgagagtga cgtttctta gggctggagg gccagttcc actcaaggct cctcgtctg acattcaac tctatctc
tgaaaaccat tctcgcagc agaattggtt ggttcgctc ctgagttgg ctctagtgac tgcagactca atgactggga
cttagactgg ggtcggcct cgtctgaaa agtgcctaa aaaatctct cagttctct tgcagaggac tggcggggg
acgcgaagag caacgggccc tgcacaaagc gggcgtctg ggtgggtggag tgcgcatgta cgcgcaggcg cttctctg
ttggctgct gcagcagcag gcggcagcac agcacctgca cgaacaccg ccgaaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag
gagcgggttg ataccgagc tgaggtagaa aaacgtctc gagaagggga ggaggatcat gtaccccgg aagtaggacc
tcgtccagc gtgctgggt ttggccgag ccatgatct ccgaatctgg ttggcatcc aycatacygc caatgcaca
acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca gagaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat
aaaaccataa aatatttagc cctctgttc tctgttact ggccagaaa tggtaaccaat tttcagttg ttgactgac agctcttt
gccacaagca agagagaatt taactgtt tcaacccgg gggagttggc tgtgttaaag aaagaccatt aatgcttta gacagtg

Figura 2B

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQFCSPGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA
SALRPGLRRTTILFLKLALFSAHC

Figura 2C

aaggctgggg ttgcctgggg cgaggttact calcctgggc lcaggtaaga gggcccgagc tcggaggcgg cacatccagg
ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc aggaaagcag gtgccaggc catgatctgg actgcaggct
ggctgctgcl gctgctgctt cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtac agctgcgtgc agaaagcaga tgacggatgc
lccccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc gtgggggagg tggagacat
ccacggacaa ttctcgctgg cagtgcgggg ttgcggttcg ggactccccg gcaagaatga ccgcggcctg gatcttcag
ggcttctggc gtatccag ctgcagcaat gcgctcagga tcgctgcaac gccaagctca acctcacctc gcgggctc
gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgtc cagctgtgtg ggctgagcc gggaggcgtg
ccagggtaca tcgcccgcg tctgagctg ctacaacgcc agcgtatctg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca
ccttgacggc agctaatgtg actgtgtcct tgcctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgcactcg ggatggagta
acaggcccag ggttcacgct cagtggctcc tgttccagg ggtcccgtg laactctgac ctccgcaaca agacctact
ctcccctga atcccacccc ttgtccggct gccccctca gagcccacga ctgtggctc aaccacatct gtcaccact
ctacctggc cccagtgaga cccacatcca ccacaaacc catgccagcg ccaaccagtc agactccgag acagggagta
gaacacgagg cctcccggga tgaggagccc aggttactg gaggcgccgc tggccaccag gaccgcagca atcaggggca
gtalcctgca aaaggggggc cccagcagcc ccataataa ggctgtgtgg ctcccacagc tggattgca gccctctg
tggccgtggc tgtggtgtc ctactgtgag ctctccacc tggaaattc cctctcact actctctgg cctgggtac cctctctc
atcacttct gtcccacca ctggactggg ctgcccagc cctgtttt ccaacatcc ccagtatcc cagctctgc tgcgtggt
tgcggcttg gaaataaaa taccgttga tatattctg cagggtgtt ctactttt gaggacagct cctgtatct tctatcct
gtctctccg ttgtctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag ctgtcacggg gaagggtgaga gagaggatgc
taagcttct actcacttc tctagccag cctggactt ggagcgtggg tgggtggga caatggctcc cactctaag
cactgctcc cctactccc gcatcttgg ggaatcgtt cccatattg ctcttact agactgtgag ctctcgagg
gcagggaccg tgcctatgt ctgtgtgta tcagttctg gcacataaat gccicaataa agatttaatt actttgaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

Figura 3A

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAP
GVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQOCAQDRCN
AKLNLTSRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGC
FDGNVTLTAAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYF
SPRIPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTSAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGEHEASRDEE
PRLTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLAVAAGVLL

Figura 3B

gatccgcttt gcgcatccca gtgattcttg ggttccgct gtagtllcgg aaggagacat cgaagcaggg cgaggcgag
agggcgltgc ygactcatgc ccagtcggc agtgcgggg cccaagccct gcagtgctac agctttgagc acacctactt
tggcccttt gacctcaggg ccatgaagct gccagcacc tctgtctc atgagtctt tgaggctatc ctgtctctg
acaccgggta tgcgcgccc gtgaccctgg tgcggaagg ctgtggacc gggcctctg cgggcccagac gcaatcgaac
cggcctccc aacctgagcc aagcaccga ccgcccagc ctgagcggc ccgagtcta cgcctgtatc ggggtccacc
aggatgactg cgtatcggc aggtcccagc ggtccagtg taccaggac cagaccgct gctccaggc caatggcaga
atgacagtg gcaattctc agtccctgtg tacatcaga cctgccacc gccctctgc accaccaggc gcaccaccag
ccccggaca gccatgacc tccaggctc ctgtctgag ggtacctct gcaacaggaa atccatgacc cagccctca
ccagtcttc agccaccacc cctcccag cactacaggt cctggccctg cctcccag tctctctgt ggtgggctc
tcagcataga ccgcccctc aggatgctg ggacaggct cacacacctc attctgtg ctccagccc taccatag
ctactgaa aatgatgta aagtaagaat tgcactctg tccctctg gccctctc tcccgcctt gtccccaca acctggcca
cagtactga agaaactga cacagtcacc agcatcccc gggagggcaa aacagccatg tctgccccg atgaagaga
attctgatc cagctgtac tcaatgagc ccagccagc accaggcacc ccataacag gcttctgtg ctctctcc
agagcctgtc gcagctctg gaggagc tacaatgat tcttattag tgcctatg agaagccca taagcagt
gcccatacag ttatgagcc aggccttga gctaaagc atgggtcaa atcccagc caccattcag cctgcagaga
ccatgagca gttacttaag ccaggctctg gagctaagc gcatgggtc aaatcccag tccagcattc agcctacaga
gacctgggt gattactta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaatcca gctccacctc tgcctgca
gagacttgg gtgagtact tgcctctc gtgcaaat tctcaccct ataagggtga ggtgaaaata aactctata catgacaaga
actacttac agtagttga gtgaggatc aacgatga acatttaga ctgggacac agcagtggc cagtgtaat
gggctactg tcaatagccc taagtcacag gtaacaaac tgagggcaa aagcactgg ttgagctgt gtatctagt
agtatgatt cagggaccag attcccagc ccacgaacg ctaagcaacc ccacctcct aacacatgag tggcattaa
cttcacagaa aaacacacaa gcgcaagtc agcgaggta aattcctca gctataaaga tccgggaga cttctggag
gaattcacc ttgagcaaaa tctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag gaagcgcaat ctggttagg
gagacagct ggacaaagg ctgagggagg aaggagcaca aggagtgcag gacacttca tgagtgcagg acacttcat
aactgcatg acttcataga gatggatcc tttagctgt tctctgca catgctgac catgtctt cacatctt ttgccctg
atctccag caactcag agagaagcaa aaaagtaagt tgcctctgc tattgtctga atgtttgt ctccccaaa tcatctt
gaaacctaat taccaaagt atattactg gagggtgggc cttgggagg tggtagatc atgagggtg agccccatg
aataggata gtcccctat aaaagagcc ctggagagct gcctgccc tccaccaca tgagaacaca gccagcagg
gcctataagc aagaaagtg gttctacca gccatgaa ctgtgtgtc attgattga gacttcccag actccagagc
tatgagacat aaattctgt tgtataga ccaaaaaa aaaaaaaaa

Figura 4A

gattcttggg ttccgcgct agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag ggcgttgcgg actcatccc
 cagtcggcag tgcggggctc caagccctgc agtgctacag CtttgagCaC acctactttg gccccittga cctcagggcc
 atgaagctgc ccagcatc tcgtccctcat gattgctttg aggctatcct gtccttgac accgggtatc gcgcgccgt
 gaccttggg cgggaaggct gctggaccgg gccctctgcg ggccagacgc aatcgaacc ggacgcgtg ccgccagact
 actcgggggt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc ccacctatg actcatgacg cctccccaa cctgagccaa
 gcaccgacc cgcgcagct cagcggcgc gagtgctacg cctgtatcg ggccaccag gatgactgcg ctatggcag
 gtcccacga gtccagtgc accaggacca gaccgctgc ttccagggca gtggcagaat gacagtggc aatttctag
 tccctgtga catcagaacc tgcaccggc cctcctgac caccgagggc accaccagcc cctggacagc catcaccctc
 cagggctcct gcttgagggg gtacctctgc aacaggaaat ccatgacca gccctcacc agtgctttag ccaccaccc
 tcccagca ctacaggctc tggccctgct cctccagtc cctctgctgg tgggctctc agcatagacc gccctccag
 gatgctggg acagggctca cacacctcat tcttctgct tccccccta tccatagct cactggaaa tcatgtaaa
 gtaagaatt cactctgtc cctctggcct tccatctc ctgccctgt gccccacaac ctggccaaca gacttgaag
 aaactggaca cagtaccag catccaggg gagggcaaaa cagccatgc gtgccctgat gaagagcaat tctgatcaca
 gctgttact actgagcacc agccaggcac caggcaccac ataacaggg tctctgtct cctctccag agcctgtgc
 agctttagg gggagctata caatgatgc tttattagt tcatcatgag aagcccaata agcagtatc cctaacagt
 agtaggccag gctctggagc taagctgat yggttcacat ccagctcca ccattcagcc tgcagagacc atgagcagt
 tactaagcc aggccttggg gctaagctgc atgggttcaa atccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga
 gttactaag ccaggctctg gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gacttgggt
 gattacttg agctctctgt gccaatatt tctcacctat aaggtggagg tgaataaaa cctataaca tgacaagaac tacttcacag
 tagtgcagt gaggattcaa cgagatgaac atttagtact tgggacacag cagtggcca gtataaagg gctacttgc
 ataagcccta agtcacaggt caacaactg agaggtaaaa gcacttgggt gacttgtgt atctagttag tatggattca
 gggaccagat tccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctcctaaa cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa
 acucacaagg caaagttag cgagggtgaaa ttccaagc tataaagatc aggggaagact tctggagga attcaccctt
 gagcaaaatc ctaaaggatc aatagttagt ggcaaaaaga agcaggagga agcacattt aggtagagga gacagcctgg
 acuaaggtct gaggaggaa ggaacacaag gattgcagga cacttcata actgcatgaa ctctatagag atgggatcct
 ttatcatgt cctctgac atgcttgacc atgttcttc acatgcttt tggcacttga tctttccagc aactcagtga gagaagcaaa
 aaagtaagt gcalccg

Figura 4B

MKLPSISCPHECFEAILS LDTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTQSNADALPPDYSVVRG
CTTDKCNAHLMTHDALPNLSQAPDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQ
TACFQNGRMTVGNFSVPVYIRTCHRPSCCTTEGTTSPWTAIDLQGSCCEGYLCNRKSMT
QPFTSASATTPRALQVLALLLPVLLLVGLSA

Figura 4C

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt cctcaggagat ggacacttct cacactacaa agtcctgttt gctgattctt cttgtggccc
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgttacca gtgctatgga gtccatttg agacttctg cccatcaatt
acctgccccl acccigatgg agtctgtgtt acicaggagg cagcagttat tctggattct caaacaagga aagtaaagaa
caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttctt gttgccagga
agacctctgc aatglagcag ttccaatgg aggcagcacc tggaccatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag
tctcctgca gaccttgctc tgatggtcct cccaatgacc tccaccttg tccitttatc ctcattgtgca acaattcttc ctggagcct
ctagtatga attatgagt atagaagctc caaggtagga gtagtgtgtg aaataccatg ttitgccttt atagcccctg ctgggtaggt
agggtctcta atcctcicta gggcittcaa gtcgtactt cctagaatgt cttttgttg tggattgctg ctcattgacc tggaggcaca
cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatccat ccaacataa gtatctgggg tctgcaatg
ttcccacatg tctctgaat gtcccctgt tgagtccaat aaacctttg ttcccacaa aaaaaaaaaa aa

Figura 5A

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVVPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTL

Figura 5B

gctccggcca gccgcgggcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
 caggacaggc tgcittggti tglgacctcc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa galcttcttg ccagtgtctg
 tggctgccct tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcitgaacc agaagagcaa tctgtactgc
 ctgaagccga ccatctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc ggcattggga atctgtgac
 atttggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgtg gcttccatgg
 gcatcagctg ctgccagagc tttctgtgca attcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt
 gccgggctgc tgcagagcct gctgccggcc ctgctgcggt ttggcccctg accgccaga cctgtcccc cgalcccca
 gctcaggaag gaaagcccag cccittctgg atcccacagt gtaggggagc cctgactcc tcactgcct galctgtgcc
 ctgggtccca ggtcaggccc acccctgca cctccacctg cccagcccc tgcctctgcc caagtgggcc agtgcctc
 acttctgggg tggatgatgt gaccttctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct ggagcttac ggtccaacat
 cagaccaagt cccatggaca tgcagacagg gtccccaggg agacctgtc agtagggatg tgccttggc tgtgtactg
 ggtgtgcagt gcacgtgaga gcacgtggcg gcttctgggg gccatgttg gggaggagg tgcctcagca gccaggagag
 cctcagctcc tgcagcccc tgcctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagccittg ggggttgggg tttctgccac
 ttccgggtct aggccctgcc caaatccagc cagtctgcc ccagcccacc cccacattg agccctctg ctgcttgggt
 gccccaata aatacagatg tcccc

Figura 6A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

Figura 6B

ccagictgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga gcacagagga gtgggcccggg
accatgcggg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctgggtg tggctgcctg cggagagctg gcgcccggccc tgcgctgcla
cgtctgtccg gagcccacag gagtgtcgga ctgtgtcacc atcgccacct gcaccaccaa cgaaacctg tgcaagacca
cactctac cgggagata ggtacctt cccaggggga ctccacgggtg accaagtcct gtgccagcaa gtgtaagccc
tcggatgtgg atggcatcgg ccagaccctg cccgtgtcct gctgcaatac tgagctgtgc aatgtagacg gggcgcccgc
lctgaacagc ctccactcgg gggccctcac gctctcca ctctgagcc tccgactgta ggtccccgc ccaccccat
ggccctatgc ggcccagccc cgaatgcctt gaagaagtgc ccctgcacc aggaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Figura 7A

MRGTRLALLALVLAACGELAPALRCYVCPEPTGVSDCVTIATCTTNETMCKTTLYSREI
VYPFQGDSTVTKSCASKCKPSDVDGIGQTLPVSCCNTELCNVDGAPALNSLHCGALTLL
PLLSRL

Figura 7B

aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgttccgct tgcggcggc gctgcatctg ctgctgctat tgcgggcccg
ggccgagaaa cccccggcc atggcglcca cagccagggc caggggtccc gggccaactt tgtgtcttc gtaggcagg
ccggaggcgg cggcccggc ggtcagcagc tggccagct gcttcagtca tgcagctc agcagcaaca gcagcagcag
caacagcaac agcagcttca gccccgcag ccgcttcc cggcgggtgg gcctccggcc cggcggggag gagcggggc
tggggggc tggagctgg cggaggaaga gtccgacagg gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca
acaacctggc ggtgctcag tgcctgacagg atgtgaggga gcctgaaaat gaaatttct cagactgcaa tcatgtgtg
tggaaatata agctgaacct aactacagat cccaaattg aatctgtggc cagagaggtt tgcaaaicta ctataacaga
gattaagaa tgtgctgatg aaccggttgg aaaaggttac atgtttcct gcttagtga tcaccgaggc aacatcactg
agtatcagt taccagtac attaccaaga tgacggccat catlltagt gattaccgtt taatctgtgg ctccatggat gactgcaaaa
atgacatcaa cattctgaaa tgtggcagta ttcggcttgg agaaaaggat gcacattcac aagtgagggt ggtatcatg
ttggaaag agctgtgaa agaagcagaa gaaagagaac ccaagattca agttctgaa ctctgcaaga aagccattct
ccgggtggct gagctgcat cggatgact tcacttagac cggcattat atttgcctg ccgagatgat cgggagcgtt ttgtgaaa
tacacaagct ggtgagggca gagtgtataa gtccctttt aaccataat ttgaagaatc catgagtga aagtctcag
aagcacttac aaccgcca aagctgattg cccaggatta taaagtcagt taticattgg ccaaatcctg laaaagtac
ttgaagaaat accggtgcaa tgtgaaaac ctcccgcat cgcgtgaagc caggctctcc tactgttaa tgtccctgga
gtcagctga cacagaggc gacaagtcag cagtgagtc cagggggaga tgcggalla ccgacgcag tigtggaag
acttttct gagccctgag atcatcctaa gcctcgggg ggagattgaa caccattgtt ccggattaca tgcaaaagg
cggaccctac actgtctgat gaaagtagt cgaggggaga aggggaacct tggatgaac tgcagcagg ccttcaaac
actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgact gatcgagct tgaatgaagc ttgtaatct gtaaccaga
cagcctgcaa acatataaga tctggagacc caatgactt gtcgtcctg atggaacatt tatacacaga gaagatggt
gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtattca tctccggga ttggaagctg gaccctgct tgtaccgaa
gtgcccaggga gacgttctc gtcttgcga caccacgggt tggatgaga ccagtgaatt tatgcctcag ggagctgtgt tctctgtt
atacagacac gcttaccgca ctgaggaaca gggaggagg ctctcaggg agtccgagc tgaagtcaa aggatcctac
accagcgtc catggatgc aagctggate ctgccctca ggataagtgc ctgattgac tgggaaatg gtcagtgag
aaaacagaga ctggacagga gctggagtc ctcaggacc atctggatga ctggtgtgtg gagtgtagag atatagttg
caacctact gagttagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttctga tgagagcctg tgagccata attcagaact
ctgccacga tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag tcttgatac agaacaaca ccagaaggac
atgacgaga agtgtgccat cggagtacc cactccagc tggtcagat gaaggattt cggtttctt acaagttaa aatggcctgc
aaggaggacg tgttgaagct ttgcccaac ataaaaaga agggggact ggtgatctgc ctgagcacga ccgtgcgcaa
tgacactctg caggaagcca aggagcacag ggtgtccctg aagtccgca ggcagctccg tgtggaggag ctggagatga
cggaggacat ccgcttgag

Figura 8A

ccagatctat acgaagcctg caagagtgac alcaaaaaact tctgtccgc tgtgcaatat ggcaacgctc agattatcga
 atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag caccgctgc caccaaaaag tattaagct gcaggagaca gagatgatgg
 acccagagct agactacacc ctcagtggg tctgcaagca gatgataaag aggttctgtc cggaaagcaga ttctaaaacc
 atgttcagct gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatccaa atgcaaacag atgataacca agcggcagat
 caccagaac acagattacc gcttaaacc catgtaaga aaagcctgta aagctgacat tcctaaatc tgtcacggtg
 tctgactaa ggccaaggat gattcagaat tagaaggaca agtcatctct tgcctgaagc tgagatgc tgaccagcgc
 ctgtctcag actgtgaaga ccagatccga atcattacc aggagtccgc cctggactac cgcctggatc ctgagctca
 gctgactgc tcagacgaga tctccagctc atgtgctgaa gaagcagcag cccaagagca gacaggtcag gtggaggagt
 gcctcaaggt caacctgctc aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa gtgctaaaca tgcctgaagga aagcaagca
 gacatcttg ttgaccggt acttcatact gcttgtccc tggacataa acaccactgc gcagcatca cccctggccg
 cggcgtcaa atgtcctgtc tcatggaagc actggaggat aagcgggtga ggttacagcc cgagtcaaaa aagcgcctca
 atgaccgat tgagatgtg agttacgag caaagggtgc cccagcagat ggcttctctg atctgcat gcaagtaatg
 acgtctcat ctaagaacta cattctctc gtgatcagtg ggagcatctg tatattgtc ctgattggcc tgaltgttg accgatcacc
 aagcgagtga cacgagagct caaggacagg tagagccacc tgaccacca aaggaactac ctatccagtg cccagttgt
 acagccctc tgtatagcat cccactcac ctgctctc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc attagcagat
 gtccactcg ttgtccatc cagcctccac tctgtccat ggtgtctc tctctcac cgtgcagcag cagcagctgg
 tctgtgggt tactgcctt gttggcaaa ctgggtta cctgcctgta gacaagctc tctatacca acagaactc cgtacttcc
 agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggcttttta agaaaaccac caaaaaaaaa a

Figura 8A (continuación)

MAACGRVRRMFRLSAALHLLLLFAAGAEKLPGHGVHSQGQGPANFVSFVGQAGGGG
 PAGQQLPQLLQSSQLQQQQQQQQQQQLQPPQPPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE
 EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENEISSDCNHLLWNYKLNLTDPKFE
 SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI
 CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSACLEKGLVKEAEEREPKIQVSELCKK
 AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCR
 EALTTRQKLIHQDYKVSYSLAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESAVHR
 GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPHILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR
 GEKGNLGMNCCQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
 MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCQGDASRLCHTHGWNSETSEF
 MPQGAVFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLG
 KWCSEKTETGQELECLQDHLDDLVECRDIVGNLTELESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
 HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE
 DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP
 DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
 LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
 MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIIQESAL
 DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLKIKTELCKKEVLNMLKE
 SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND
 RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
 LKDR

Figura 8B

gcgctgagct cgcgcggac lcaagatggc ggctgtgga cgtgtacgga ggatgttccg cttgtcggcg gcgctgcatc
 tgcgtctgct attcgcggcc ggggcccaga aactccccgg ccaggggcgtc cacagccagg gccagggtcc cggggccaac
 ttgtgtcct tctagggca yggcggaggc ggccggcccgg cgggtcagca gctgccccag ctgcctcagi catcgcagct
 tcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccgccgc agccgccttt cccggcgggt gggcctccgg
 cccggcggg aggagcgggg gctgggggg gctggaagct ygcggaggaa gatlcttca gggaggagct gaccgcgtg
 tgcctaaagc acacctggag caacaacctg gcgggtctcg agtgcctgca ggatgtgagg gagcctgaaa atgaaattc
 ttcagactgc aatcattgt tgtggaatta taagctgaac ctaactacag atcccatt tgaatctgtg gccagagagg ttgcaaac
 tactataaca gagattaag aatgtgtga tgaaccggtt ggaaaagggt acatggttc ctgcttggg gatcaccgag
 gcaacatcac tgaatcag tgcaccagt acattacca gatgacggcc atcatttta gtgattaccg ttaactgtt ggcttcatgg
 atgactycaa aatgacatc aacattcga aatgtggcag taitcggctt ggagaaaagg atgcacatc acaaggtag
 gtgtatcat gcttgagaa aggcctggg aaagaagcag aagaagaga acccaagat caagttctg aactctgca
 gaaagccatt ctccgggtg ctgagctgc atcggatgac ttacttag accggcatt atatttctg tccgagatg
 atcgggagcg tttttgaa aatacacaag ctggtaggg cagagtgtat aagtgcctt ttaaccataa altgaagaa
 tccatgagtg aaaagtctg agaagcactt acaaccgcc aaaagctgat tcccaggat tataagtca gttattcatt
 ygcaaatcc tgaatagt acttgaagaa ataccggtg aatgtgaaa acctccgcg atcgcgtgaa gccaggctt
 cctactgtt aatgtcctg gactcagctg tacacagagg gcgacaagc agcagtgagt gccaggggga gatgctgat
 taccagcga tttgatgga agactttct ctgagccctg agatcctt aagctgcgg ggggagattg aacaccattg
 ttccgatta catgaaaag ggccggacctt acactgtctg atgaaagtag ttcgagggga gaaggggaa cttggaatga
 actgccagca ygcgctca acactgatc aggagactga cctgtgtca gattaccgca ttgatcagc ttgaaatgaa
 gcttgtgaal ctgaaacca gacagcctg aaacalataa gatctggaga ccaatgac ttgtctgccc tgaatgaaaca ttatacaca
 gagaagatgg tagaagactg tgaacacctt ctttagagc tgcagtatt catctccgg gattggaagc tggacctgt
 cctgtaccg aagtgccagg gagacgttc tctcttgc cacaccacg gttggaatga gaccagtga tttatgcctc
 agggagctgt gttcttctt ttatacagac acgcctacc cactgaggaa cagggaagga ggctcaccg ggagtccga
 gctgaagtc aaaggatct acaccagct gccatggatg tcaagctgga tcttgcctc caggataagt gcctgattga
 tctgggaaaa tggtcagtg agaaaacaga gactggacag gagctggagt gcctcagga ccatctggat gacttgggg
 tggagttag agatagatt ggcaacctca ctgagttaga atcagaggat altcaaatag aagccttct gatgagagcc
 tgtgagcca taatcagaa ctctgccac gatgtggcag ataaccagat agactctgg gacctgatg agtctctgat
 acagaacaaa caccagaagg acatgaacga gaagtgtgcc atcggagta cccactcca gctggtgag atgaaggatt
 ttcggtttc

Figura 8C

ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgtgaag cttgcccac acalaaaaaa gaaggtggac gtggatgatc
 gcctgagcac gaccgtgccc aatgacactc tgcaggaagc caaggagcac aggggtgtccc tgaagtgccg caggcagctc
 cgtgtggagg agctggagat gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgaagagtg acatcaaaaa
 ctctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaacaa gaagcagcta agcaccgct
 gccacaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat ggaccagag ctgaactaca ccctcatgag ggtctgcaag
 cagatgataa agaggttctg tccggaagca gattctaaaa ccatgttga gtgcttgaag caaaataaaa acagtgaatt
 gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgcagc atcaccaga acacagatta ccgcttaaac cccatgtaa
 gaaaagcctg taaagctgac altcctaaat tctgtcacgg latcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga
 caagtcatct ctggcctgaa gctgagatal gctgaccagc gcctgtctc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat
 ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tctcagctc cagctgact gctcagacga gatctccagt ctatgtgctg
 aagaagcagc agccaagag cagacaggtc aggtggagga gtgctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg
 tgaataaagg aagtgtctaa catgctgaag gaaagcaag cagacatctt tgttgaccgc gtactcata ctgctgtgc
 cctggacatt aaacaccact gcgcagccat caccctggc cgcgggcgtc aaatgtctg tctcatggaa gactggagg
 ataagcgggt gaggttacag cccgagtca aaaagcgcct caatgaccgc attgagatgt ggagttacgc agcaaagggt
 gcccagcag atggctctc tgatcttgc atgcaagtaa tgactctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag tgggagcctc
 tctatattgt tctgtattgg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcaggt gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata
 caggctcagc acaatggctt ataaaggitt agtgtgtct caggatgta caggcagctc agcctgacct ttctgcacac
 tccagacaaa ctccccagc aagctcttt gtgcctctac gtggagaggg tgtgaaagt taccacata aaagatggag
 gatllaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaa aaaaaaaaa

Figura 8C (continuación)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLLFAAGAELKLPQGQVHSQGQGPANFVSFVGQAGGGG
 PAGQQLPQLPQSSQLQQQQQQQQQQQPQPQPPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE
 EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENESSDCNHLLWNYKLNLTDPKFE
 SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIIIFSDYRLI
 CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSACLEKGLVKEAEEREPEKIQVSELCKK
 AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCR
 EALTTRQKLIHQDYKVSYSLAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESVHR
 GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPHILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR
 GEKGNLGMNCQQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
 MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCOGDASRLCHTHGWNSETSEF
 MPQGAVFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLG
 KWCSEKTETGQELECLQDHLDDLVECRDIVGNLLESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
 HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE
 DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP
 DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
 LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
 MLRKACKADIPKFCGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRADQRLSSDCEDQIRIIIQESAL
 DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLKIKTELCKKEVLNMLKE
 SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRQLQPECKKRLND
 RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
 LKDRLQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSPA

Figura 8D

caaaaacttc tglccgctg tgcaatatgg caacgcicag attatcgaat gtctgaaaga aaacaagaag cagctaagca
 cccgctgcca ccaaaaagta ttaagctgc aggagacaga gatgatggac ccagagctag actacacct catgagggtc
 tgaagcaga tgataaagag gtctgtccg gaagcagatt ctaaaacct gttgcagtc tgaagcaaa ataaaaacag
 tgaattgat gatcccaat gcaaacagat gataaccaag cgcagatca ccagaacac agattaccgc ttaaaccca
 tgltaagaaa agcctglaaa gctgacatt ctaaattctg lcacggatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta
 gaaggacaag tcatctctg cctgaagctg agatatgctg accagcgct gtcttcagac tgaagacc agatccgaat
 cattaaccag gaggccccc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc agacgagatc tccagtctat
 gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggctcagg ggaggagtgc ctcaaggta acctgctcaa gatcaaaaca
 gaattgtga aaaaggaagt gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaagcaga catctttgtt gacccggctc ttcatactgc
 ttgtccctg gacallaac accactgcgc agccatcacc cctggccgcg ggcgtcaaat gtctgtctc atggaagcag
 tggagataa ggggtgagg ttacagccc agtgcaaaa gcgctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca
 aaggtggccc cagcagatgg ctctctgat ctgcatcgc aagtaatgac gtctccatc aagaactaca ttctctgt gatcagtggg
 agcatctga taitgtctt gattggcctg atgtgtggac ggatcaccaa gcgagtga caagagctca aggacaggtg
 gagccactt gaccacaaa ggaactacct atccagtcc cagttgtac agcctcttg tatagatcc ccactacct
 cgtctctc agaagtga ccaaccctg gtagagcat tagcatgt cactgcgtt gtccatca gcctccact
 gtgctatgg tgcctctc ctctcaccg tgcagcaga gcagctggc gctggggtg ctgctttgt ttggcagat tggttacct
 gccgtgctc aagctctct cataccaaca gaactccgg tactccaga accaactcac ctgacctga acicaaaggc tttttaaga
 aaaccacaa aaaaaaaaaa tttttaag aaaaaatgt alatagtac gcatcctc caggctgat ttggcaatg ggttatgtc
 ttcatatga ctgtgtaaa caaagacagg acttgagggg gaagcacacc acccagtgt ccatgactga ggtgtctgt
 tcatctca gaagcctt ggggcctcgc caggccgtg gtctcaccg aggcgtgggt gggcagcct tcccaggct
 gtgtgggtc ctgcttct ctgctgagac agtgacgtt tccagtcc acctaatca gccactgct gtcacagccc
 cacagccatg ggtattctg tggctcctc gctcattga agcaagcat gaccctct agacaagggc agctggggag
 ggaagggac cggaagttg tgaagtgaa cagtccatc atctgactg agaggctgga tctgagtc cggggcagca
 ggaaccagg aacctctc ctccaggca gcacaggact cagcgtgctc tggaccggcc ctgctgagc tacagtact
 ctggaagctc tgcctcat caggaggcag gactgtggc ggaggggtcc tgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca
 ggaagttgga gccagaggt tgaactact tctttatt ttacagctac aatacaggtc agagacaatg gctataaag gtttagtgtg
 gtctcaggat gtgacagga gtccagctg acctctgc acactcaga caaactccc agacaagctc cttgtgctc
 ctactggag aggtgtgga aagtatcac ataaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

Figura 8E

MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNSELMDPKCKQMITKRQIT
QNTDYRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCED
QIRIIIQESALDYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCK
KEVLNMLKESKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALDKRVRLQ
PECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMC
GRITKRVTRELKDR

Figura 8F

aalltagcca gctgiggigg cacatacctg taatcccagc tacttgagag actgaggcag gagaatcact tgaaccggga
 galggagtlf gcagtgagcc gagatgggct cactgtactc cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaa
 aaaaaaaa aaaaaaaga cattcaagc tggaaagatt ggctccctaa ctttgagcct agctcttca ttaaagtaat aataaaagta
 gaactctaca ttatataat ggtttgact ttccaaagtg atttccatc ctgagcagtc ctgtgaagga ctaaataagg tgttcaggg
 tagactlgyc attgtgttlf gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtagacaga attgaaagta aagcctgatt ctctgtctc
 aaggcgactf tgctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtc acaataagt ctccagaaca tatgacatct
 ccagcctaaa ccaagctcac cttccatgc tggctcccic atgcagacgg aggacatccg cttggagcca gatctalacg
 aagcctgcaa gagtgacatc aaaaaactct gtcccgctgt gcaatagggc aacgctcaga ttatcgaatg tctgaaagaa
 aacaagaagc agctaagcac ccgctgccac caaaaagtat ttaagctgca ggagacagag atgatggacc cagagctaga
 ctacaccctc atgaggggtct gcaagcagat galaagaggg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgcagtgct
 tgaagcaaaa taaaacagf gaattgatgg atcccaatg caaacagatg ataaccaagc gccagatcac ccagaacaca
 ggtaagatct tggctggct ctccctggccc cgtggagtal ctgaaaagga attcagtgcc tgtagagta cctgtctcaa
 ctcccagggc ttgtgtctt gggaatttta agggaggagt ctgagtgtaa gcaggccctt cctccttga ggagcatcca
 gaaaaatgga gggagagica ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc agaaggaatc
 aggcggcgag tccitggaaa gaaaaatcta gaaatcaat aaaactical gagtgtcca ggagaatgta cgggtaatct
 gattcgyaac agaaacattf cacctctgag ttggaagacc tctgaagta atggtcacag tgagttggat attgtattc tttttagt
 ttctcaaaag tgtctgtat ggggaagggt gctgatgccc ctttgattf tctgaggact ccttagagta ttggagctc cacaaaaacc
 cgcagagtag aaagattcct gaggacctcc agaagtactc gttacaagf catattgctg attaaaaaa gttgagtag
 agctcagtaa atgtttattg aatagataaa tccatgggtg tagtcatgat cattgacata atatgctccc tttaggaagg tggataicta
 aaaatgtgtg aatcagggtg aatgtttgt cacatgctca ctgcttcta ctctagatta ccgctaaac cccatgttaa gaaaagcctg
 taaagctgac attcctaaat tctgtcagg taccctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagctatct cttgctgaa
 gctgagatal gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat ccaggagctc gccctggact
 accgcctgga tctcagctc cagctgcaat gctcagacga ggtgggattf gcgtgcaaaa ctggttaccg acagagctgc
 tcagagaagf ttccactgga gaaaagtgt ttactttctc tccctcagc cgtgaatgat ctgggtgaatf gaaggccatc ttctaggctc
 tccatggctc gcattcctgt tctttgtaac actgaatca acttggcaatf agtctgaca ctctaaagcg ttgtccata ttctctgtt
 gaacaagggt gtcttctat tatagctctc tgtaaattg ttcttccctt ctcttattc tggatgttaa acccaagacc tccagaaaag
 ataaaagtgc tttagctgg gcacgggtgc tccagcctgt aatcccaaca ctttgggagg ccaaggaggg tggatcatct
 gaggicagga gtcaagacc agcctggcta acatggagaa atctgtctct actaaaaata caaaaaatta gccaggcgtg
 gtggcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaacc cgggaggcgg tggttcagf
 gagctgagat catgccactg cccccagcc tggcgacag aggaagactc tgtctc

Figura 8G

**MQTEDIRLEPDLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETE
MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQIT
QNTGKILAWLSWPRGVSEKEFSGCRVTCNSQGFVAWEF**

Figura 8H

ctgagaggaa gttttatcig tgcagccctt cictgaggat ggacacttct cacactacaa agtcctgttt gctgattctt ctigtggccc
 lactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgttacca gtgctatgga gtcccatttg agacttcttg cccatcaatt
 acctgcccci accctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa
 caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttctt gttgccagga
 agacctctgc aatgtagcag ttcccaatgg aggcagcacc tggaccatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag
 tcttctgca gacctgtctc tgalggctct cccaatgacc tccaccttg tcttttatc ctcatgtgca acaattctc ctggagccct
 ctagtatga attatgagtt atagaagctc caaggtagga gtatgtgtg aalaccatg tttgacctt atagccccctg ctgggtaggt
 aggtgctta atccicta gggctttcaa gtctgtactt cctagaatgt cttttgttg tggattgctg ctcatgacc ctggagcaca
 cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatcaccat .ccacacataa gtatctgggg tcttgaatg
 ttccacatg tatctgaat gtccccctgt tgagttcaat aaacctttg ttccccaaa aaaaaaaaaa aa

Figura 9A

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVFPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTL

Figura 9B

aictgacaga acttgccact gtcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga tggacacttc tcacactaca
aagtcctgtg tgcctattct tctgtggcc ctactgtgtg cagaaagagc tcagggactg cagtgtctac agtgctatgg
agtgccaatt gagacttctt gccagcagt lacctgccgc gcctctgatg gattctgcat tgcicaaac atagaattga
ttgagygactc tcaaagaagg aactaaaga cccgtcagt ccttcttc tgcctgtctg gtgtgccaat cagggatcct
aacatcaggg agaggacttc ctgtgcagc gaagacctct gcaatgcagc agtccact gcaggtagca cctggacat
ggcaggggtg ctctgttca gcctgagctc agtcgtctg cagacctgc tctgatggtc ctccaatga cccccacct ttccttta
tctcatgtg caaccactct tctgtgagt cctctagtga caattatat gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc
ctgttcacc ttatagccc ctgtgggtg agtgcccagc tctctctag gcttcaaa tctgtacttc ttgcaatgcc attagtgt
ggattctat tctggccct ggaggcatgt ggccagcaca tgcaacaggc agtattcaa ggtattatag taccacc
cacacataag tctgtgggt cctgcagggt tccatgtat gcctgtcaat gaccctgtt gactccaata aaagctttgt tctccagcc
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

Figura 10A

MDTSHTTKSCVLILLVALLCAERAQGLQCYECYGVPIETSCPAVTCRASDGFCAQNIELI
EDSQRRKLRQCLSFCPAGVPIRDPNIRERTSCCEDLCNAAVPTAGSTWTMAGVLLFS
LSSVVLQTL

Figura 10B

gccaccccc gccagcccg tgcctalaag gccttggcaa tgcagggggc cgcacigcic ccagacgaca tcagagatga
 ggacagcatt gctgctcctt gcagccclgg ctgtggctac agggccagcc ctaccctgc gctgccacgt glgcaccagc
 tccagcaact gcaagcattc tgggtctgc ccggccagct ctgctctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag
 ggggaatctg gtaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca ccagctaca cctgcaagg ccaggtcagc agcggcacca
 gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa gctgcacaac gctgcacca ccgcaccgc cctgcccac
 agtgcctca gcctggggct ggccctgagc ctctggccg tcatcttagc cccagcctg tgacctccc cccagggag
 gcccctcatg ccttccctc ccttctctg gggattccac acctctctc cccagccgca acgggggtgc caggagcccc
 aggtgaggg ctccccgaa agtctgggac caggtccagg tgggcatgga atgctgatga ctggagcag gccccacaga
 cccacagag gatgaagcca cccacagag gatgcagccc ccagctgat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc
 cccgattc acactcctc tgtttgtg ccgtttatt ttgtactcaa aictctacat ggagataaat gatttaaacc agaaaa

Figura 11A

MRTALLLLAALAVATGPALTLRCHVCTSSSNCKHSVVCPASSRFCKTTNTVEPLRGNLV
KKDCAESCTPSYTLQGQVSSGTSSTQCCQEDLCNEKLHNAAPTRTALAHSALSGLALS
LLAVILAPSL

Figura 11B

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
 caggacaggc tgcittggtt tgtacctcc aggcaggagc gccatcctcl ccagaatgaa gatctcttg ccagtctgc
 tggctgcccl tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtctctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc
 ctgaagccga ccaictgctc cgaccaggac aactactgcg tgaactgtc tgcctagacc ggcatggga atctctgac
 attggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatcccag aaggcgtcaa tgttggtgtg gcttccatgg
 gcaicagctg ctgccagagc ttctgtgca attcagtc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt
 gccgggctgc tgcctagcct gctgccggcc ctgctcggt ttggccctg accgcccaga cctgtccc cgatcccca
 gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atcccacagt gtatgggagc cctgactcc tcactgccl gatctgtcc
 ctggtcca ggtcaggccc acccctgca cctccactg cccagccc tgcctctgcc caagtgggccc agctgccctc
 actctgggg tggatgatg gacttctt gggggactgc ggaagggagc agggctcct ggagtctac ggtccaacat
 cagaccaagt cccatggaca tctgacagg gtcccaggg agaccgtgc agtaggatg tctgcctggc tgtgtactg
 ggtgtcagt gcactgaga gcactgggc gctctgggg gccatgttg gggagggagg tctgccagca gctggagag
 cctcagctcc tctagcccc tgcctggca cagctcatg cactcaagg gcagccttg ggggtgggg ttctgccac
 tccgggtcl aggcctgcc caaatccagc cagctctgcc ccagcccacc cccacattgg agccctctg ctgcttgg
 gcctcaata aatacagatg tccc

Figura 12A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

Figura 12B

actgtcctg caacctggc agagaggaag taaggactgg tgcaggagg gagctgtag gttgatctg tgcagccct
 ctccaaggaat ggacagtgt cacactaaa agtcctgtg actcatcct ctgtgggcc tattgtgtgc agaaagagct
 caggggctgg agtgcataa ctgcctggga gttcacttg gaattgcctg caaatcaatt acctgcccct acccigtgc
 agtctgcat tctcagcagg tagaactat tgtggactc caaagaagga aagtaaagaa caaactctgc ttcccttct gccctgtaa
 tctgaaaaat atggagatcc tgggtactac tgtcaacgtg aatattcct gtgcaagga agacctctgc aatgcacat ttccactgg
 aggcagcacc tggacatga caagggctct tctgttaaat ctgggctcgg tcttctgca gacctgctg taaaaggicc
 tccaaggac cccaccctt gttgtttat cctcattgc aactattcct tctggagcc ctctagtat gaattatgag atattgaagc
 tccaaggagg gagtagtgt tgggaatc gttgttcaa ctctatagcc ctgcttgg aaatgcccc ctctctcta ggaattcaa
 atatgactt cctagaatgc catttgttg tggctgcta atctggccc tggaggccc tggctagcag agggtagagg
 cagaatcca aggtattaag ccatcaccat ccacacataa gtgtctgagg ttctgcagga ttctcatgta tgcggctta tgcctctg
 ttgagtcaa taaaccttt gtctcc

Figura 13A

ES 2 379 413 T3

MDSCHTTKSCVLILLVLLCAERAQGLECYNCLGVSLGIACKSITCPYPDAVCISQQVELI
VDSQRRKVKNKLCFFPCANLENMEILGTTVNVNTSCCKEDLCNAPFSTGGSTWTMTR
VLLNLGSVFLQTL

Figura 13B

ctgcagccag gctgagagg aagtaaggac tgggtcagg agggagctgc taggtgacaa agggaagaac cctcaggata
gggctgigg! gggagtgaga ttaggaaaga agagctgggt ggggggga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca
gggaaagctg ttagaggggt tggagggagg gaatattgga tggctgagcc gctgagagc ccaggggtgt gatcaggggt
ctattaactg gctccaactt ccaaggttt atctgtcag ccttctcca aggalggaca ctctcacga gataaagtc tgtgtctga
tcttctgt gacctactc tgtcagaaa gagctcagg actggagtgt taccagtgt atggagtccc attgagact tctgccat
cattacctg ccctacct gatggattct gctgtctca ggaggaagaa ttattgcaa actcctaaag aaagagagta
aagagccgtt ctgccatcc ttctgccct gatgaaattg aaaagaagt taccctggat cctaacacca agatgaatat ttctgtgc
caggaagacc tctgcaatgc agcagttccc actggaggca gctcctggac cacggcagg gctctctgt tcagcctggg
ctcagctctc ctgcagacc tgalgtgat gctcccacc

Figura 14A

MDTSHEIKSCVLILLVTLLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSFTCPYPDGFCVAQEEFI
ANSQRKRVKSRSCHPFCPDEIEKKFILDPN TKMNISCCQEDLCNAAVPTGGSSWTTAGV
LLFSLGSVLLQ TLM

Figura 14B

gttatcagag gtgagcccgt gctcttcagc ggagaagatc cctacactgg ccgccggcca cttctgtgg gccgtggggf
 cclcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgcgttcc acacgcgcct tcccagggc lcccgcgccc gttctgcct
 ggccgcccggc cgtccaaca gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggccgc cagcggccgc gaggccctga
 gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggccgggtggg aggcgcgcgc cccggggcgg gcggggctcc ccctaccggc
 cagaccyggg gagaggcgcy cggaggctgc gaaggltcca gaaggcggg gagggggcgc cgcgcgctga ccctccctgg
 gcaccyctgg ggacgatggc gctgctgcc ttgctgctgg lctggccct accgcgggtg lggacagacg ccaacctgac
 tgcgagaaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gagggtgaca atagagtgtg gtgtcatgtt tgtgagagag
 aaaacacttt cgagtccag aaccaagga ggtgcaaatg gacagagcca tactgcgta tagcggccgt gaaaatatt
 ccacgtttt lcatggtgc gaagcagtc tccgtggtt gtgcagcgt ggagagacc aagccagagg agaagcggtt
 tctctggaa gagccatgc cctcttta cctcaagtgt tgaataatc gctactgcaa ttagagggg ccacctatca acatcagt
 gttcaagaa talgctggga gcatgggtga gagctgtgtt gggctgtggc lggccatct cctgctctg gcctccattg
 cagccggcct cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgacct tccggagcat ggactcctc cagaccgtg
 tcaccttg cattaactt gtttctgtt gattacctt tggttgact tcccagggc ttgggatggg agagtgggga tcaggtgcag
 ttggctta acctcaagg gttcttaac tcacatcag aggaagtcca gatctctga gtatgattt tggtagaac ttttctt
 tgaatcaaa cctgtaact cattatgc tgatggccac tcttctctt gactccctc tgcctctgag ggctcagta ttgatggga
 gggaggccta agtaccact atggagagta tgtgctgaga tcttccgac cttcaggtg acgcaggaac actgggggag
 tcigaatgat tgggtgaag acatccctgg agtgaaggac lctcagcat gggggcagt ggggcacacg ttaggctgc
 cccatcca gtggtggagg cgtgtggat ggctgtttt cctcaactt lctaccaga tccaggagg cagaagataa
 ctaattgtt tgaagaaact tagactcac ccaccagctg gcacaggtgc acagattcat aaattccac acgtgtgtt tcaacatc
 aaacttaggc caagtagaga gcatcaggtt aatggcgtt cattctctg ttaagatgca gccatcatg gggagctgag
 aalcagact caaagtcca ccaaaaaca atacaagggg actcaaaag ttcagaaaa aattgaatta aaagataaaa attaa

Figura 15A

MRLQRPRQAPAGGRRAPRGGRGSPYRPDPGRGARLRRFQKGGEGAPRADPPWAPLGT
MALLALLVVALPRVWTDANLTARQRPEDSQRTDEGDNRVWCHVCERENTFECQNP
RRCKWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQCSAGCAAMERPKPEEKRFLEEPMPFFYLKCC
KIRYCNLEGPPINSSVFKEYAGSMGESCGGLWLAILLLLASIAAGLSLS

Figura 15B

ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agalacacag ccagtgatgt ggaccaccgg atggctgtg
 ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctggagtgtctacag ctgctgacag aaggcggacg atggatgct
 lccgcacagg atgaagacagtcaaatgtgg tcccgggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta
 gagaccatccacgggcaatf ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgaccgcggactgga
 ccttcacggg ctctgtggct tcttcagct acagcagtc tccgaggaccgatgcaacgc caaactcaac ctacattgc
 gaggcctcaa ccctgcaggc aatgagagtgcatalgagcc taacgggtgca gagtgtaca gctgtgtggg tctgagccgc
 gagaagtgccagggtccat gccgccggtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggtgcttcgatgg
 taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtccta ctgtccgaggctgctcca ggacgagacc tgcaccggg
 atggggtgac ggggccagga ttacactcagcggctctg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tgcacaag
 acctttctccccctgaat cccacccta gtctgtgtc cccctcaac caccgcagcc ccatccactcggcccagaa
 ctctccagc acgacctta cagcagcccc aaccagacc acctccatcaagcccac cacagccaa gccagccaca
 ctctccca tgaatggat ctgaaatcacaggaaga gggggcgctg ttgagtggag gtgtgtcggg ccatggaggt
 actgcgggccatggaggtgc tgcgggccac caagaccgca gcaatatgga gaagtatcca ggaaagggtg gggccagat
 ccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtcttgggtg tctgcagttc tgttactgt ggttcttggc gcgatctgt
 gaatgtca tctgaaaag tccatctac ttgttccc tggcccgtg gtaccaactc ttccattc tacttgact ggactggctc
 cggcccatc ctacagcatt ctacttccg actgcactgg ttgcagctt cggaaaacag tctctgttg taaatattc gctcgggtgg
 ccttacttt ttgatcggc cacagcattc cccctgatgg tgaccaggac agagggaaga gacgttact ggtgagaga
 ggcccagaga gtccacggca agctctctt tccgtttc ctgaccaggc tggaaatga ccaggcaggt agacaatgga
 tccatctcc gagcactgtg ctgcttggc acattgtcg gaaatctgt cgcctgtct ccttaggaga ctgtgaaca
 ctclacaaca gggcttgtc tctggcctct ctatgttct tctctggcac aggaaggtgt caataaagat ttgttactt tgalagtga
 gtaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Figura 16A

MDAARRGDTQPVMWTTGWLLLLPLLLCEGAQALECYSCVQKADDGCSPHRMKTVKC
GPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSVAVRGCGSGIPGKNDRGLDLHGLLAFFQLQQCEDR
CNAKLNLTLRGLNPAGNESAYEPNGAECYSCVGLSREKCGSMPPVVNCYNASGRVY
KGCDFGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDETCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGPRCNADLRN
KTYFSPRIPLVLLPPPTTAAPSTRAQNSSSTTSTAAPTTTTSIKPTTAQASHTSPHEMDLE
VIQEEGASLSGGAAGHGGAAGHQDRSNMEKYPGKGGGAQIPAKGGSGTLGSW
LSAVLLTVVAGAML

Figura 16B

tcgtcccccg cgccgtgcc gccgctgagc ccggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc gcccagagg acccccgcct
 gcagcccccg cgcctcttc aggcctatc ggagcatgctgcctgcagcc atgaagagcc tcggtctggc gctgctggcc
 ttgcttctc gccctcgccggccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt
 gcgtccgaaagcagtgccag cccaccgata ccgtttgtc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcagcaggaaggat
 cattctgtga acaagatgtg tgcctctcc tgcgacttcg itaagcggcacttttttca gactatctga tggggtcat taactctggg
 alctaaaaag tgcacgtggactgctgcgag aaagattgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc
 cctgggccctggctgggggg ctcctgtca gccggggcc tgcctctc tgggtgggc ctaagaccctccctccct
 ccgctgggc ttggagctt gtcccctaag cctgtgtc cccctcccagcctggcctg gctggggctg ggacagcaag
 gglttggcat caaggtctga ggctcacaaccctcctagat gtgagtgagc ctctccgtt tctccaccag ctccatctc
 caagcagctgaatctcca ggagtccaga cactctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggaaggactga
 gaccctccag gctccaagg ggaggagggt caagccagg acagccaacagcctggcct gaggggcatt aactacagag
 aaataaagtc acttctgagt cttgtgaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

Figura 17A

MPAPQRTPACSPRASFRPYRSMLPAAMKSLGLALLALLCPSPAHGLWCQDCTLANSSH
CAPKQCQPTDVCASVRITDPSSSRKDHSVNKMCASSCDFVKRHHFFSDYLMGFINSGLK
SRRGLLRERFVQRGIGRRTQPLGPGWGAPVQLGAWLFFGLGPKTPPSLLVGFGACPLSL
LVPLPSLAWLGLGQQGFGIKV

Figura 17B

agaagaggcg agacttttt gggTgcTccg galcgcCagt agTtctTcaa gcctcagcag ccaacTcctc cggaggcgct
 gcgTcccgcc ccagggagcg cgaatccaag gagcctgggaccagcctctg ggagccccg gcgcgggCGa TcggggCGcc
 gcgggCGaca cctgcggctcctTcggTgg cagccTcgc TgggCGgca gcagcCGag cctCGgCagc
 cTcgCagctactgtcGccg cggccagaac agcctccgct gcggTcgtgg TctTgatgc TctTccccTccccgCct
 gccgalccgg gaggalTgg gTtTcggca TcgCagcaac TttTgcggaltTtTctggc Ttccaggct ggcgTgcaa
 attcagTgtcT accagTgtga agaattccagTgaacaacg attgctcTc cctgagTtC atcTaaatt gcaccgTgaa
 cgtTcaagacatgtTcaga aagaagTgat ggagcaaagT gctgggatca Tglaccggaa gTcgtTgcTcTcagcag
 cctgtTcTat TgctTcagct gggTaccagT cctTctgtTc cctTgggaaactgaactccg Tgtgcatcag cTgTgcaac acccTctTt
 gcaatgggCC gaggcccaagaagagaggca gctTgcctc ggccatcagg ccagggctTc TcaccactTcT
 cctgtTctTccactTgccc TctgctTggc acactgctga agctaaaggga gatccaacc cctgTgcctcactgTctg gccctTcTc
 TctcaccTtC ccgagTctcT TctgggtgTc cTttattTctgggtagacaa gggagTctTt TgtTccctc cTttcaagTc acgcaagatt
 gccTgCacaaactTttTg TaagctTga accaattcTat TctgaattTc TgtgtTgTagt TgaagaaaaagcTggagc agaaagTcca
 gaccctccca Tcccaatctg gTtaaccacc gccaaggctc gctTggaaga accagccctT agaagTcatt gagatacGca
 TctgCctTtC ccaaagcctT gaggTtccat Tctgtccag TaggagTcac agTctatTca gagactgctg cTgcgTgaaG gTaaactTtgc
 TttTgcggga ggggagagcc agTtTcggct caaggctTct gaactTgcca TcatactTc cTgctcctgt aaactattTt cTggggTgga
 cccagctggT TggTctctg agccagTctg TggTgactca ggactcaagg gctggggctT agcctTcca ggcTtggcct
 cagTctgaaa agTgctTaaG aaaacctTgt TagtTctcct ggaggaagag TtactgCGcc gggaggctag gaagatgagg
 gggctgCGgg cTgagctggT gctTcctTg gTggagatga agcgggCacg cTggcgtTc TctTggTgg cTgctgCag
 agTcaggCGg cagcagagca cctgCCagaa cacctTccgg aactgctgag aggacacgTt gTaggagga gggTgacca
 cagagctgag gTagaagaag gTatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagT acgtTctggT ccagTcatgt
 TgggtTttg cTgCagccat gatccgTcgg atctgattgg gcatccaaca cacggccaac gTcaccacaa TcagTcctgg
 caggcaagaa caggagagaa aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa ccataaaat
 attagcccc TggTctgt TgctTactgg ccgagaaacg gTaccaatct Tcagctctg TgctTgTcgg cTtctTttg ccactggcaa
 aggagaattT aatgctgctT caagctcagg ggactTggct atgtTaaaa gcgtTaaatg cTtTcagacag TgtattTata cTtaccggctg
 cctgtTaatT TcaaaaatgT TtcatTgtT gctcgtgtat ccagaaaaa TctcagTtG gccaaaa

Figura 18A

MWVLGIAATFCGLFWLPGLALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQFCSPGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA
SAIRPGLLTLLFFHLALCLAHC

Figura 18B

ggcagcctg agtgaggacc tgcacatgc aggggacctg gatggtgctg ttggcactga lattgggcac cttcggggag
cttgctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaatcctgtgagtgcac caactgtgtc accaccacce actgccacat
caatgaaacc atgtcaagactacgcicta ctccctggag atgttttcc ctttcctggg ggactccacg gtgaccaagtctgcgccag
caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgtcctgtgcaa ttctgacctg tgcacgtgg
atggggcacc cagccctggc agtcctggctggcctgctct tgcctggca cttttctgc tcttgggtgt cctgctgtaa
agccatggccatctagctcc actccctgt cctgacalc ccagttcct aatgcctaga agaatacaatggccatctg
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

Figura 19A

MQGTWMVLLALILGTFGELAMALQCYTCANPVSASNCVTTTHCHINETMCKTTLYSLEI
VFPFLGDSTVTKSCASKCEPSDVDGIGQTRPVSCCNSDLCNVDGAPSLGSPGGLLLALAL
FLLGVLL

Figura 19B

atgctttta tggcaggccc tgcagccagc tggccctga ggcccctggg actccatggc gtccccaag ccttgtgtgc
tgtccictta acagtgtgg tcatgaagac ctgggtctcgggatacca agctcgagga ccttcacct cagtcctcc cactaaaca
gtacctgaaltgtaccgat gtctgtgga gaccgaagag ctgggtgcc tctggggtc tgacacctgctgacacctc
tggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggtttaatgtcatggtga gcgactgcta cagcaaggag
cagatggicc attgtcata taccgtgttccccggtgt ttggctttg galattctat cagtgtgct tctggattt
ctgcaacaalccggacaaca gaaagaatag catgcactag

Figura 20A

MLFMAGPAASWSLRPLGLHGVPQALCAVLLTVLVMKTLVLGDTKLEDLHPQSLPLNKY
LNCYRCLLETEELGCLLGSDTCLTPLGSSCVTLHIKNSSGFNVMVSDCYSKEQMVHCSY
TRASPVFGFWIFYQCCFLDFCNNPDNRKNSMH

Figura 20B

agagctggag acciggggaat ctgctgtcaa ctgctggggc lgtggacatt ctcaggacc tcaccatgaa acacctcctg
ttgtcacc ttgtcgcct actctactgc lgggtctcagctgatactcg atgtcactcc lgtacaaaag tccctgtgct gggctgtgtg
gatcgccagctctgccgct ggagccgggc cacaaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt gggaagatgtgggtttctc
taacctgcgc lgcggcacac cagaagagcc ttgtcgggag gtlctaacgaaaccaacca taagctgggc ctgaactaca
acaccacctg ctgtgacaag gataactgtaacagcccggc tccacggccc acaccgcac lggccctcat ctccctcacc
tcttggctggccctggcct ctgggtattg cattgagact agctccatgg ctacaatct accacctgctatagcctgag ctttctccc
tgttctca gagctccagc ttccagaat ctctctctcccacccct tctctgaag atcatgtccc tagtctata ceatttatt
caltggactgtacctggagl ggccttcta gccaccgctc ctctctca ctgtcact tccactccattccaccaca cacagacaca
cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacacacacacaca cccagtcct tccattcc ttctagaaca
ctctacctc tccactggccactgaaaggc tcccctctt ggacgcacac tgetgtgct ctgggatcta agctggaagaactcctgc
ttgtctccag ggagtgatc caaaaggcgc lggcctcatt gcatgggctggcttaccag accctctgct lgtccctc tacltgaga
aataaacatc agtgctaat

Figura 21A

MKHLLLLLSALLYCWVSADTRCHSCYKVPVLGCVDRQSCRLEPGHKCLTTNVYLGK
MWVFSNLRCGTPEEPCREVFNETNHKLGLNYNTTCCDKDNCNSPAPRPTPALALISLTS
LAGLGLWLLH

Figura 21B

gcclactgg cctgcctgcg atcggtacc aacaccgcac gaagtgtga cagattcca gttagacagc aggaggacc
 tggagcggc cagggggatg ttlatctct aagagaccaagagctcagge agggctctg tgcctgctt cctccctggc
 ttgagctyga tctggaccagctgctgacc tctgttca cctggcactg cctcactg cccgtcatga cccatctcaccagtgct
 ctggggccc tgalgggctt gcctgtggcc caggctctgg agtgccactgtgtgcctac aatggagaca actgctcaa
 acccatgcgc tgcacgcca tggccacctactgtatgacc acacgaacti acttaccce ataccggatg aaggtgagga
 agtctgtgtcccagctgc ttgaaaccg tgiacgatgg ctatccaag catgcatctg ccacctctgttgcagctac taccttga
 acggtyctgg ctltgclacc ccggtgacct tggccctggctccagcactc ctagtacct tctggagctt gctgtaaagc
 tgggtcccc aagccagatccactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctccaat tcactccaccaacgctctt
 ccttctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta ctacgaagaactgatggc atccagatac ctactccaa ggctatttc
 agaaggtcga catgtggacctgtaatgtgc ccacctatgg gtggggcagg ctgggctctt cctctacca
 agatcagggggcatctggggag aatgtttatg gaggaggggt cactactca gtaaggagc actgattgatagaattagt
 agccaaactc cacttcaga acctgctc agtctacca gtatagggatgggtctgtag aggtgagggg aggagagcgg
 cggagaataa cgagctggct agaagcagag aaagactcag cagggtctg tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa
 atgtgatgt gaagccatgt gaggaagccc ttgtcaltt ccactatct gaggaactct gccagacctg atgttgggat
 agccattggc caagggctc tagcaacggc gtcattcca tagyccactg aaatccctc agccccagct cagcaggccc
 ctgacctc actacagtc ttactcaca caccagctgc tgggcttga agttggcagg gacttgggag caggtgacct
 atgtattt ttgtctggcc tgtattctg ggcatggcaa gaaggatca gacgcaggc agagcagggc agtagggcga
 ctgagacagg gaaacagact ttagccagtg gcttcccagg tcccgtaggc agtctctaca tcttcagtc tctgttaca
 tccccgggag acaaatatc agggagccaa gccagtgct aggtgatgac tgcctgtgaa gtctattgt gccacagact
 gctgggtacc aagtctcagg agaaccagc ctatattag gagacacaga tctgcttct atgcagtga gctgtcctg
 ggagcctac catgctctt aactagtacc tcaactcaca tgcactgag gaaccctca aactggccc agcccagggg
 tgggatgtt ggccaatgt catggagtgg gactacctt ggagagtct tgggtcatca cactcaaat gtttattcc
 aactcccag tggtagagc tgggacaca aaggtccatc ctggggacct tcttctgtt tctaggcaga cctgaactct
 gctgtctgt agagctgatg tggtttccg cctcagttc ctctccggg gataggccac cggaggattt gggaggggtg
 ggagggcact ctgctgatgg gctcggcag gttctcagga acaggaacgg gcggggcttt agtacacagg ttagttgggt
 gggaaactggc ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggaaagtga gtctcaaggg agggcaggaa aagggagggg
 gagcgcgat gcacatgtc actcagtca ggctacagag ccaaaaggc agcactggct gtggtgtccc ctgaggccca
 ggcaagatg taggaggaag ccaatgtc cccacctga gctacatgg aacatgaca ccaccagcag cagcagcaag
 cattgagact gacctgtgga cgccatagg cactggcaag gagggtcaga ggcgggtccc tgaictagtg ggtgagggcc
 gggaaacatt atctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagct

Figura 22A

agatggcgtc ctcaacaaa actgagagga gccccagttc aggtcctccc tctaccaca agggggtggt gtggaggagg
 citgattgcc ctggagaag caccggtaci gcagagctgg gggccagctt ctltcatctg tcttagaca ccgaccagat
 agggcccaca gtggcaaac tgccacacag ccclacaaga agccctgtgc cttagtagca cagagcccca aaagggtctc
 aaltaataca gggccaagcc tgccagtggg ggggatgcag attaggggaa cagaccaga tggcctgtcc tgaacctgt
 ctggggtggt gtgatgagca tctgtctagc cactgcagg tggcttaca cactccaca cagtctgca aaagtgtatg
 aggtggatc tactgcgcc ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgaggc acttcattt cctgggcat
 tcaacttcc aggaccaaca cattcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttctt gaggctgggc ccctgaaga
 tgatagtggc tcatcaacc agagaattc agagtgcagt gttgtaggag cctatgaacc tgaatgtca gaactggagg
 ttgagggggc tgaggggtag gccaggggtg tctggccct tgtgtggaga cagagagaga gggaacatgg gatgggtag
 tagagagaag tgcaaggag cgtcagcct tctcagggt aatgctgtca gggacgaggg ccaagcctg tgagtgtct
 cacactgtga laaacagtgg ccctcaaca cagacggtgt ccagagtggc cggcagtgt tatctagagt tgcaatctg
 aagcctctg gtagtactg gagagaggcc gcttgatgg acagaccaa atgtgtgtc tctgtggga tgtaggaag
 ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtct tcaagcaga ggggtggctg gtctagcca ccagagaca gctatccagt
 gagagcata ctctgccacc gtctgtga ttacttacc ccaagcaga cggggacggg atgcagagca ccctgtct
 catctctgc ggcaagcag tgagttaca tctgaaact ctgaaagat tccaggagt ggggtgtcc ttgcttgg tcatgtta
 ctctggca agcaccgtg catcccgag cactgagtga cctgggtcc tcaagccalc tcatgttga aatgacagt
 ccagtacct ctgagctgg tctggaggc ctgtcatgg ggtctgaca gaggaggccc ccaactatg catggacgga
 cacgtgatc ctgacttc cctgggtgt gtctgtcca acccaggct ctcaccagc aaggaaatga aatccattt
 latgacacat cccctccc cagccagct cattcaacta tatccaggg tggctcctt caatgtctgt cccattgg atgaataac
 aagcgaagca ca

Figura 22A (continuación)

MTHLLTVFLVALMGLPVAQALECHVCAYNQDNCFKPMRCPAMATYCMTTRTYFTPYR
MKVRKSCVPSCFETVYDGYSKHASATSCCQYYLCNGAGFATPVTLALVPALLATFWSL
L

Figura 22B

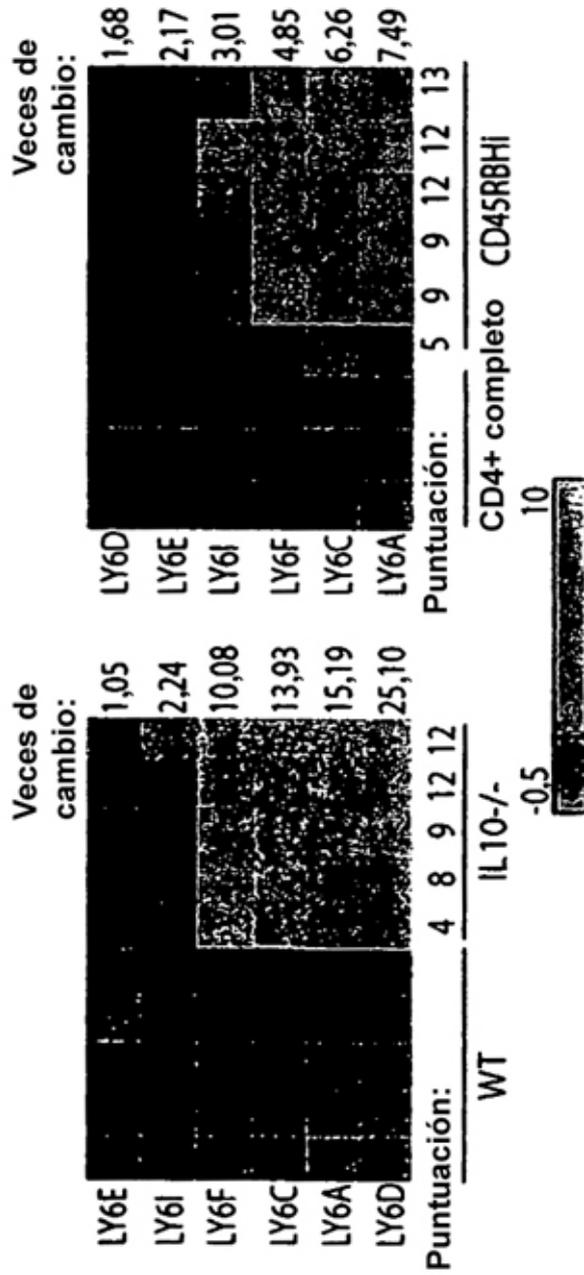


Figura 23A

Figura 23B

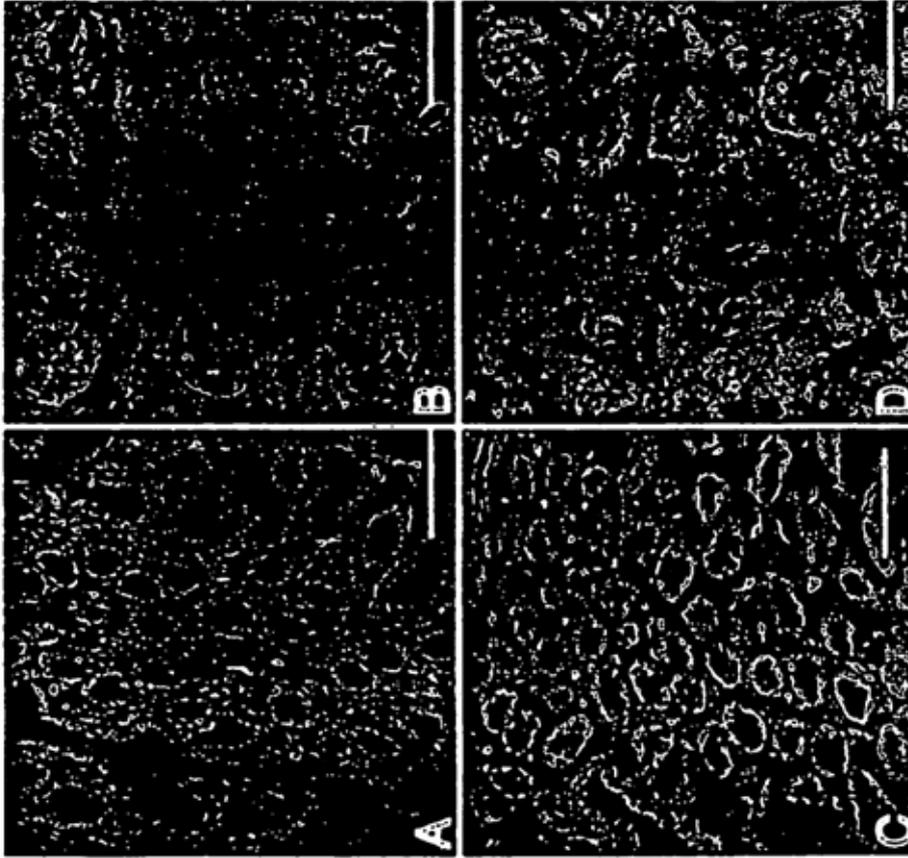


Figura 24

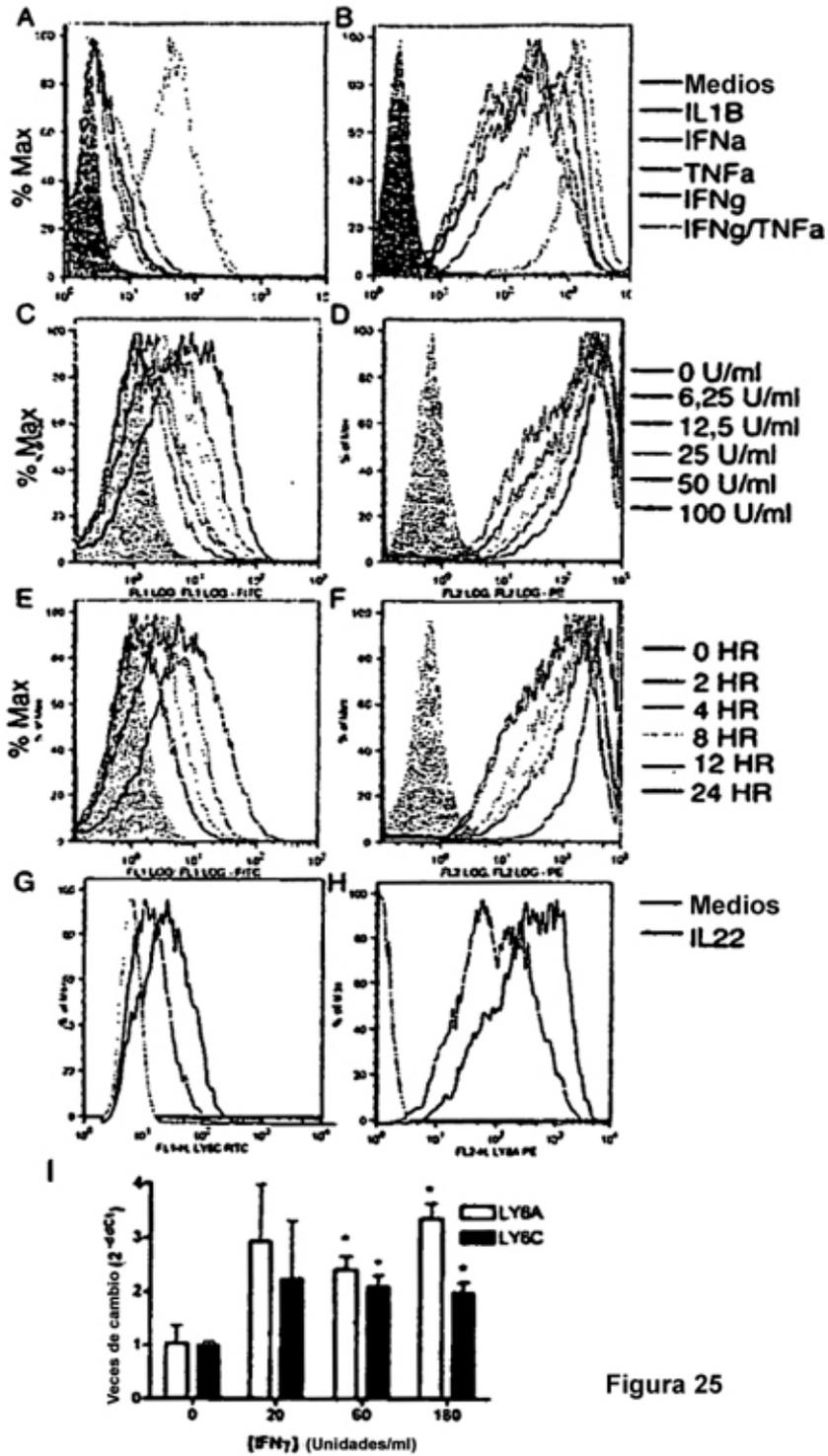
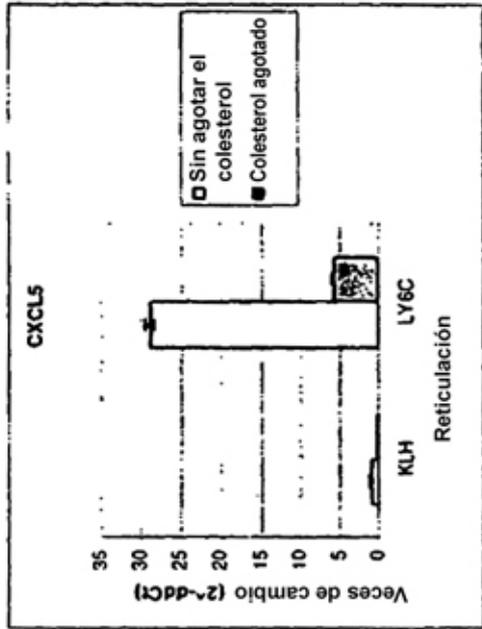
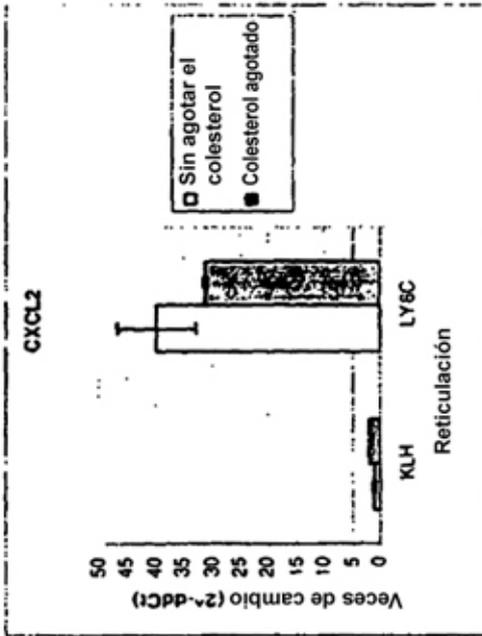


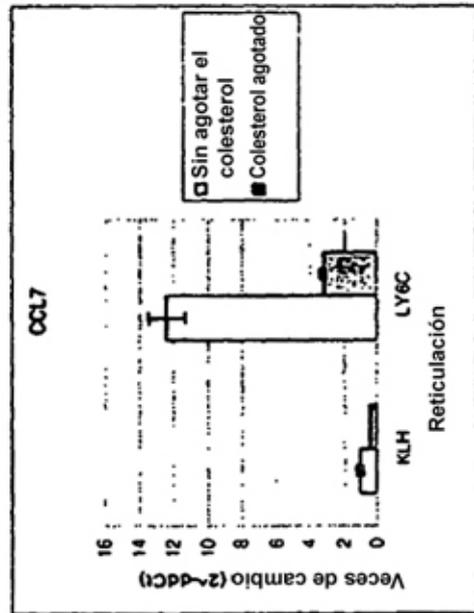
Figura 25



B



A



C

Figura 26

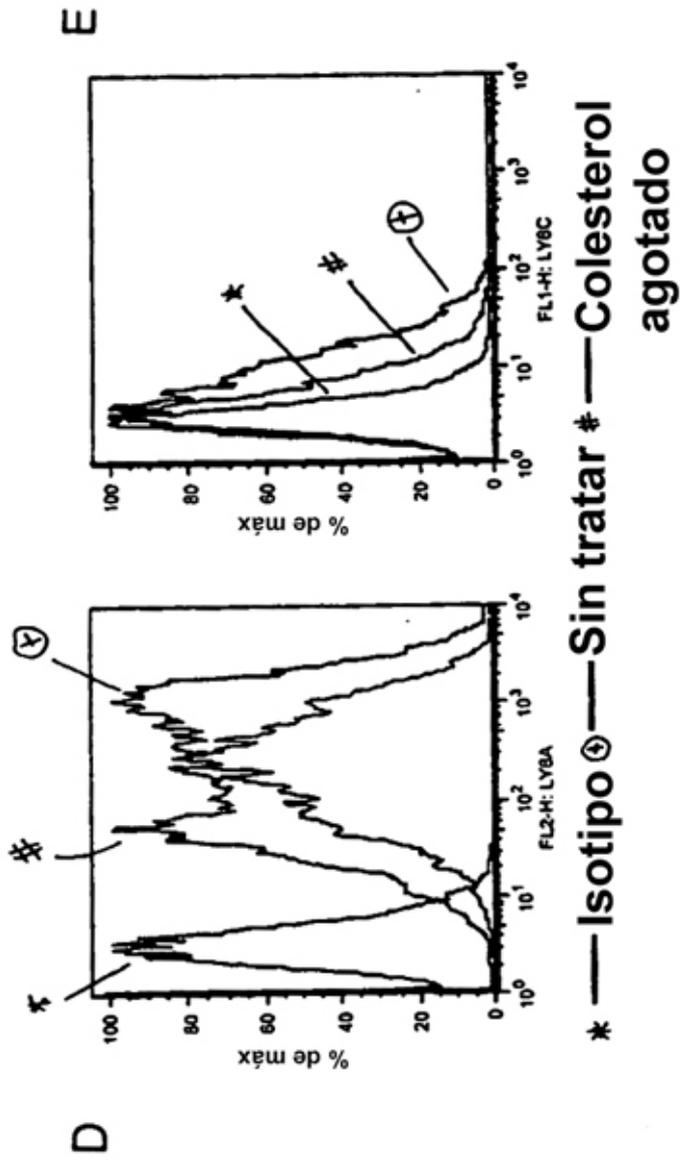


Figura 26 (cont)

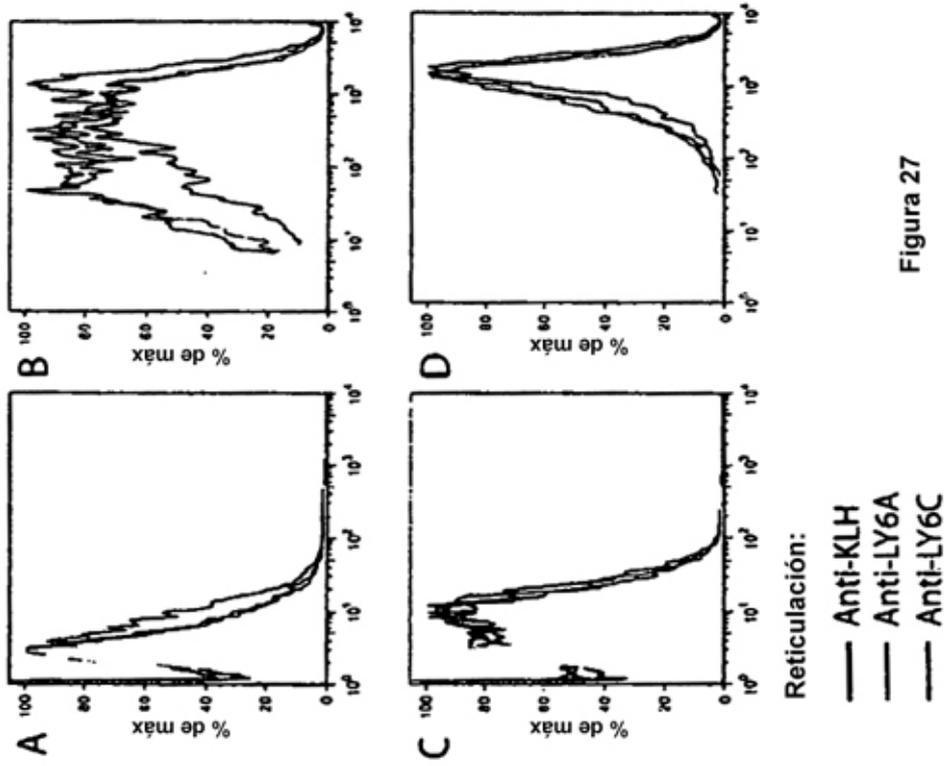


Figura 27

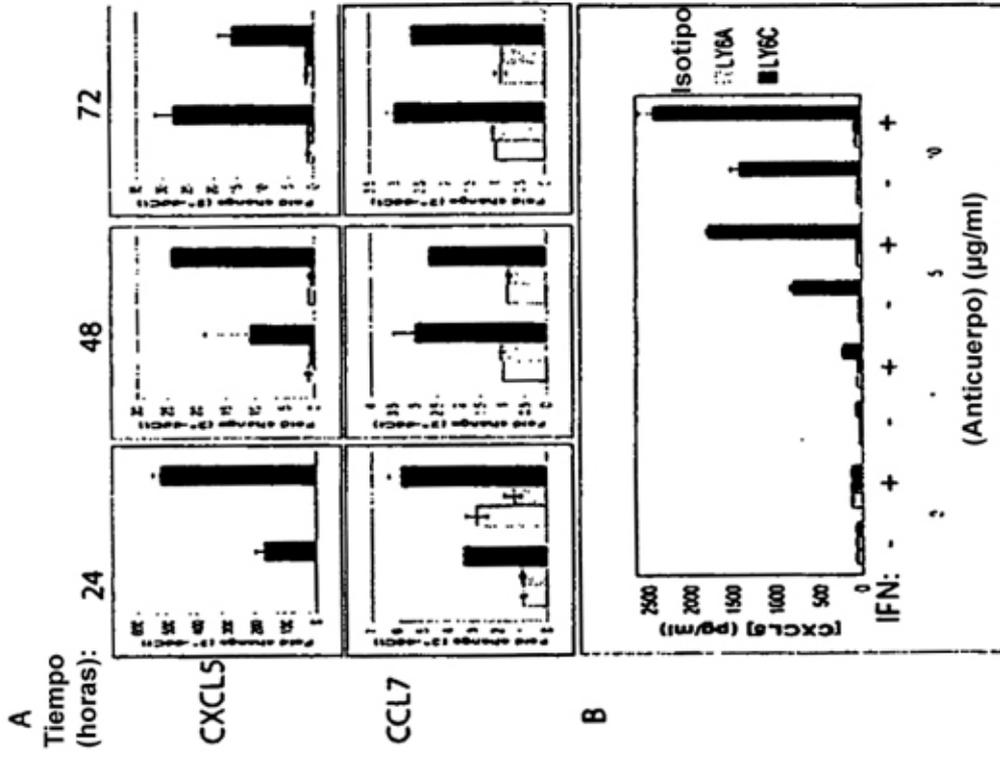


Figura 28

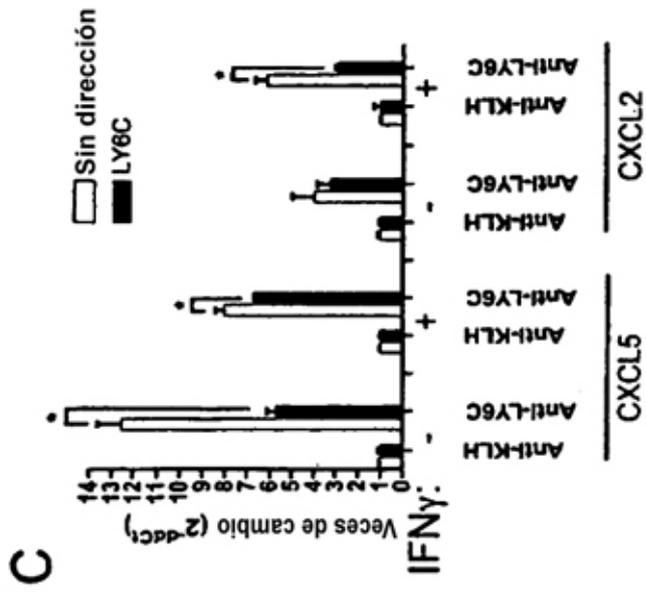


Figura 28 (cont)

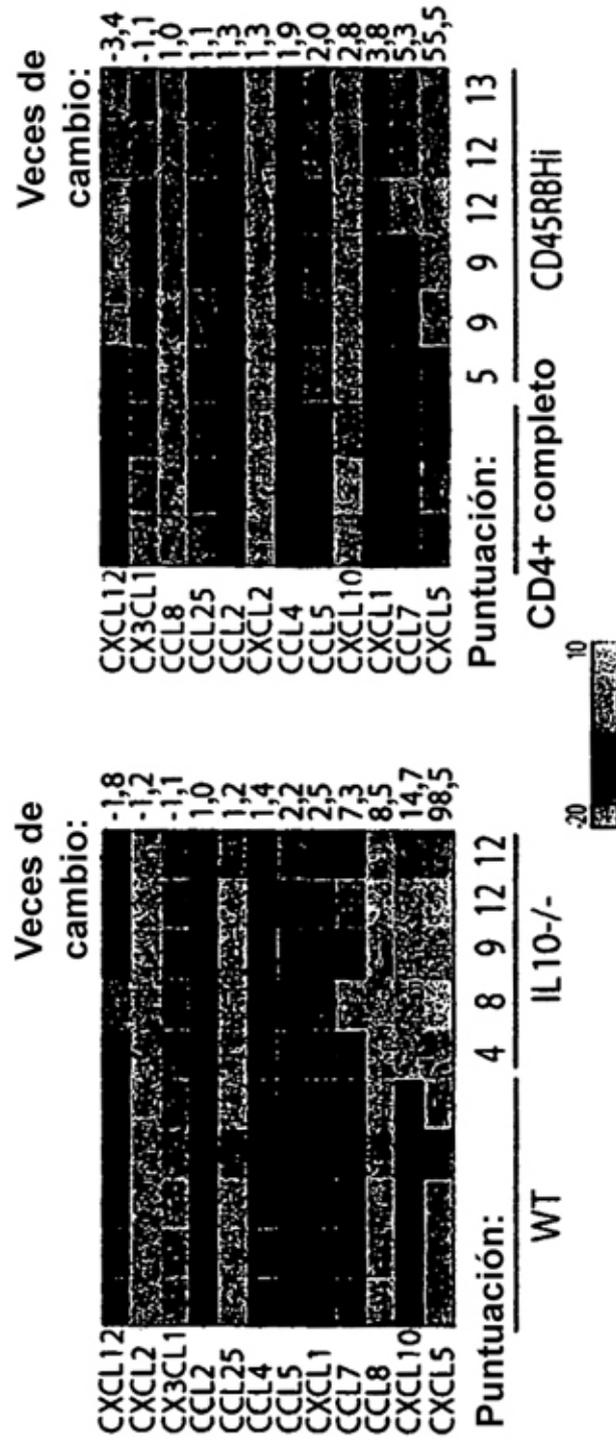


Figura 29B

Figura 29A

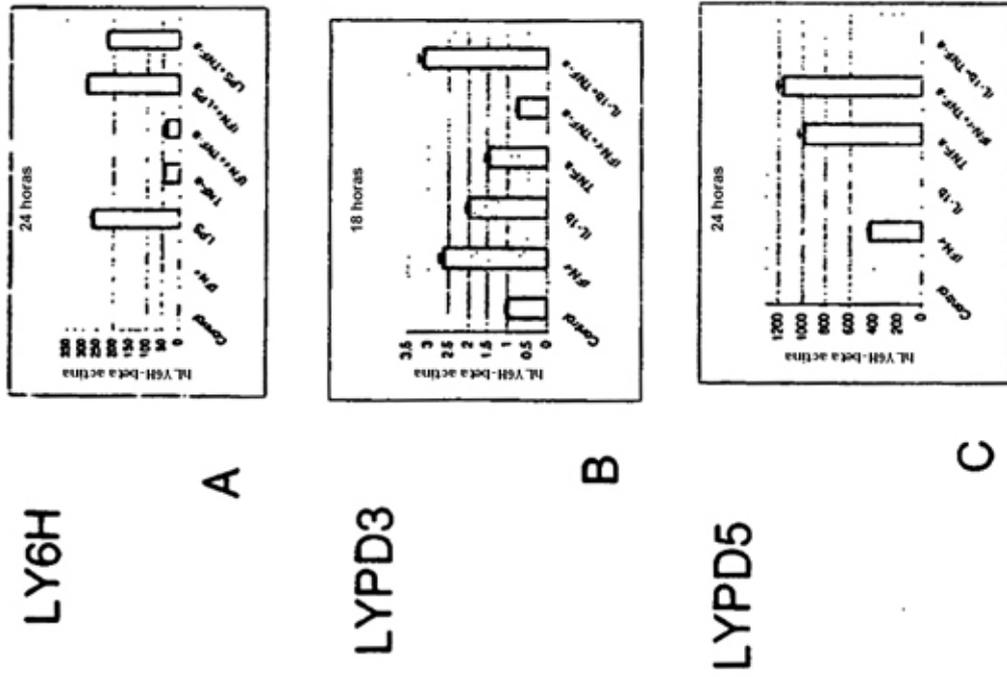


Figura 30

LYPD1

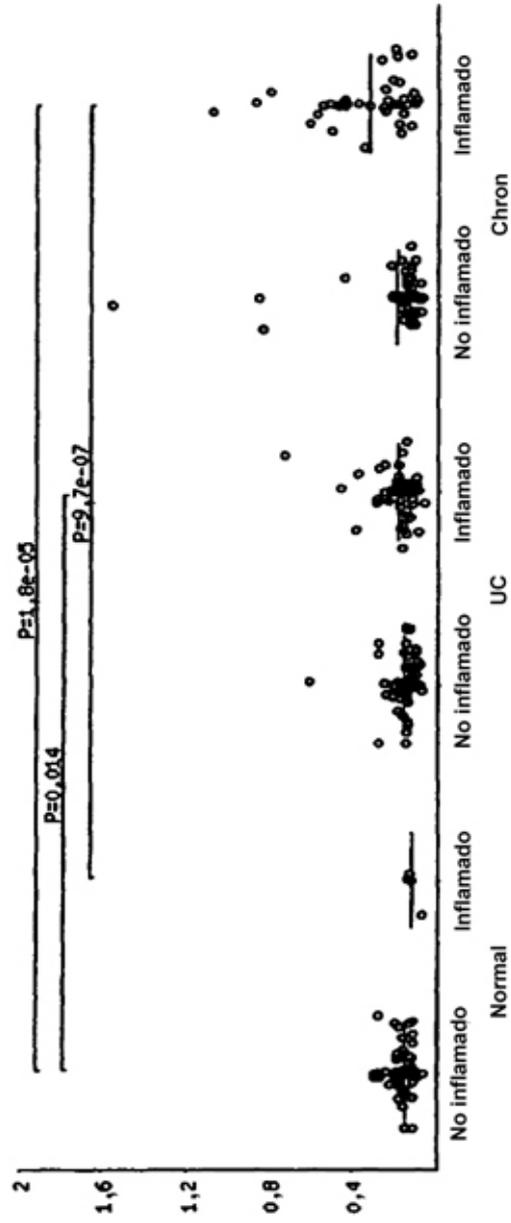


Figura 31A

LYPD5

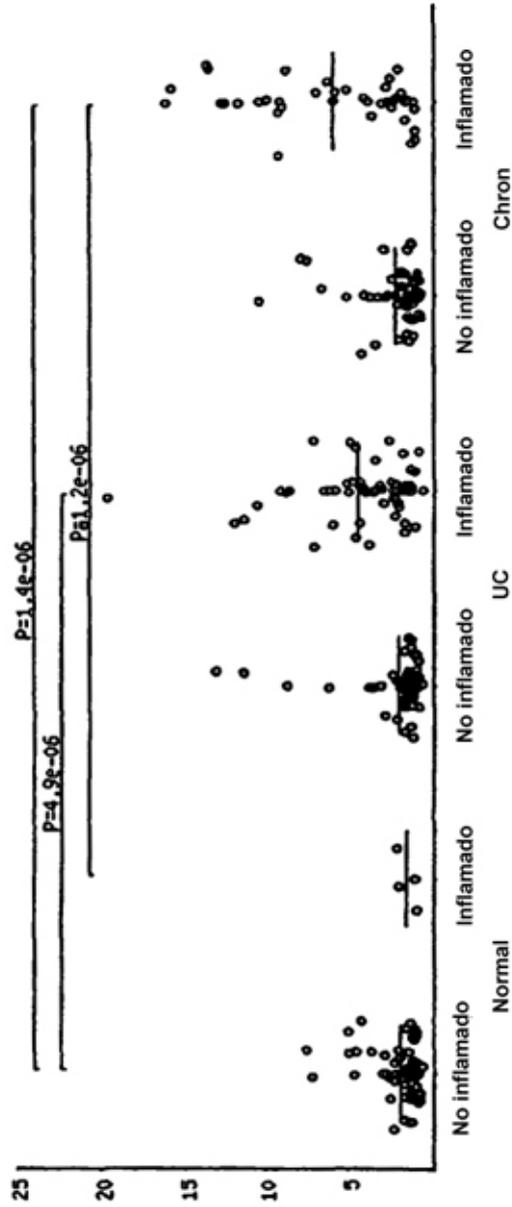


Figura 31B



Figura 32A



Figura 32B

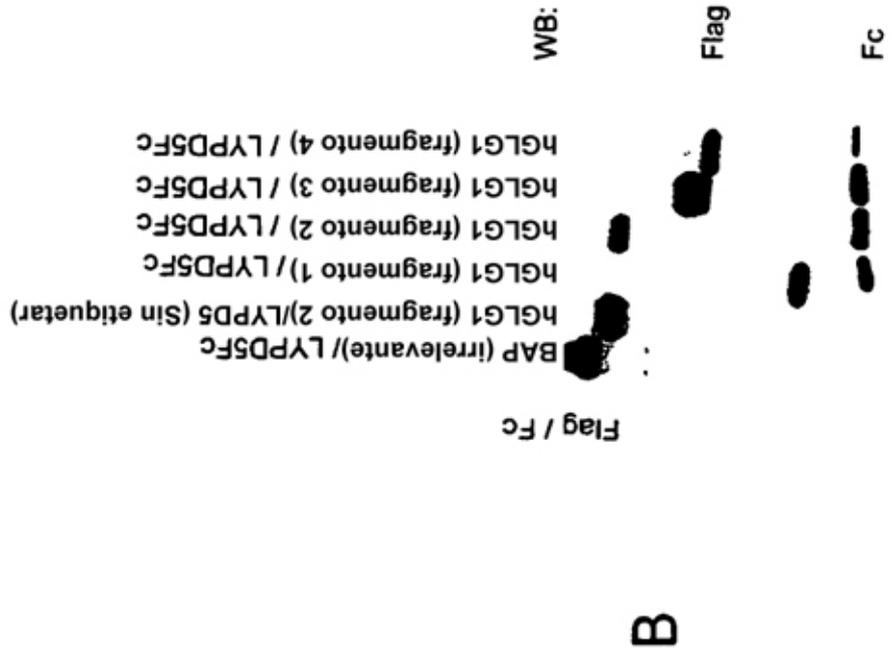
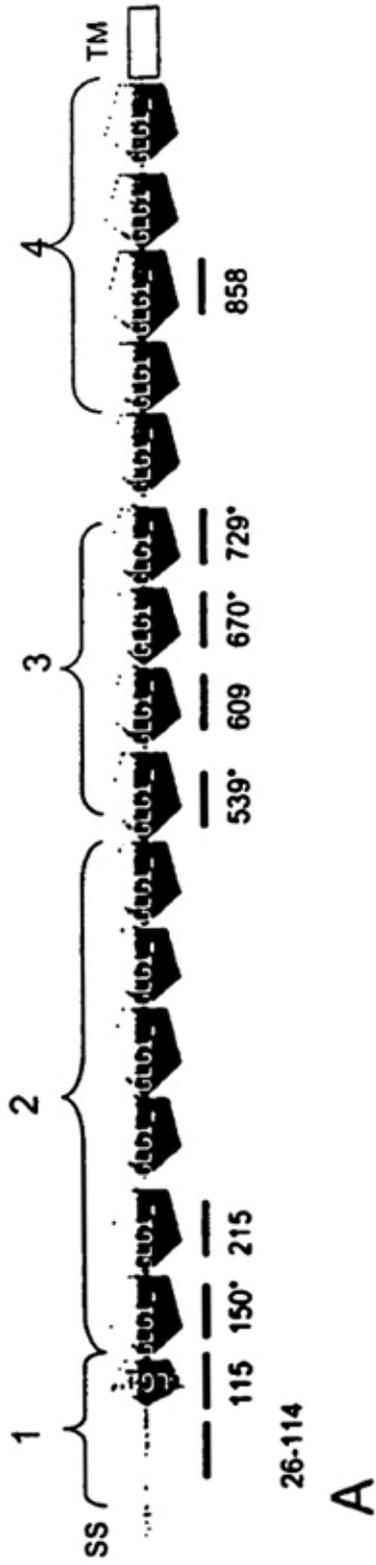
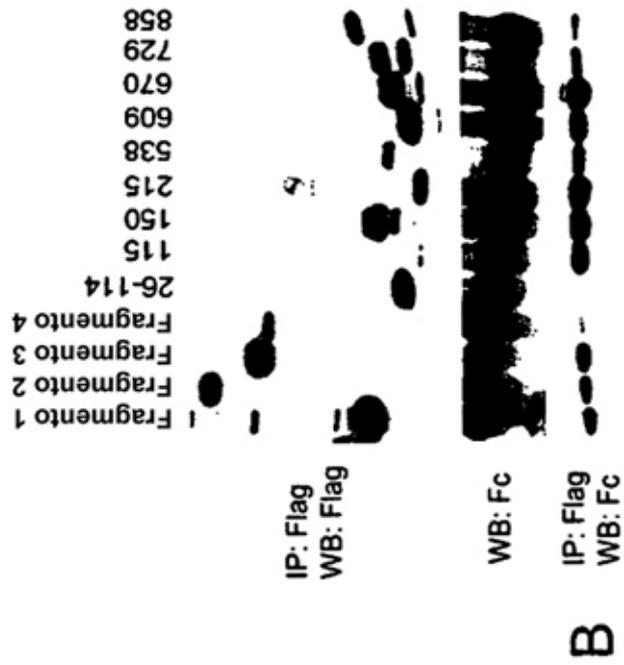


Figura 33



A



B

Figura 34

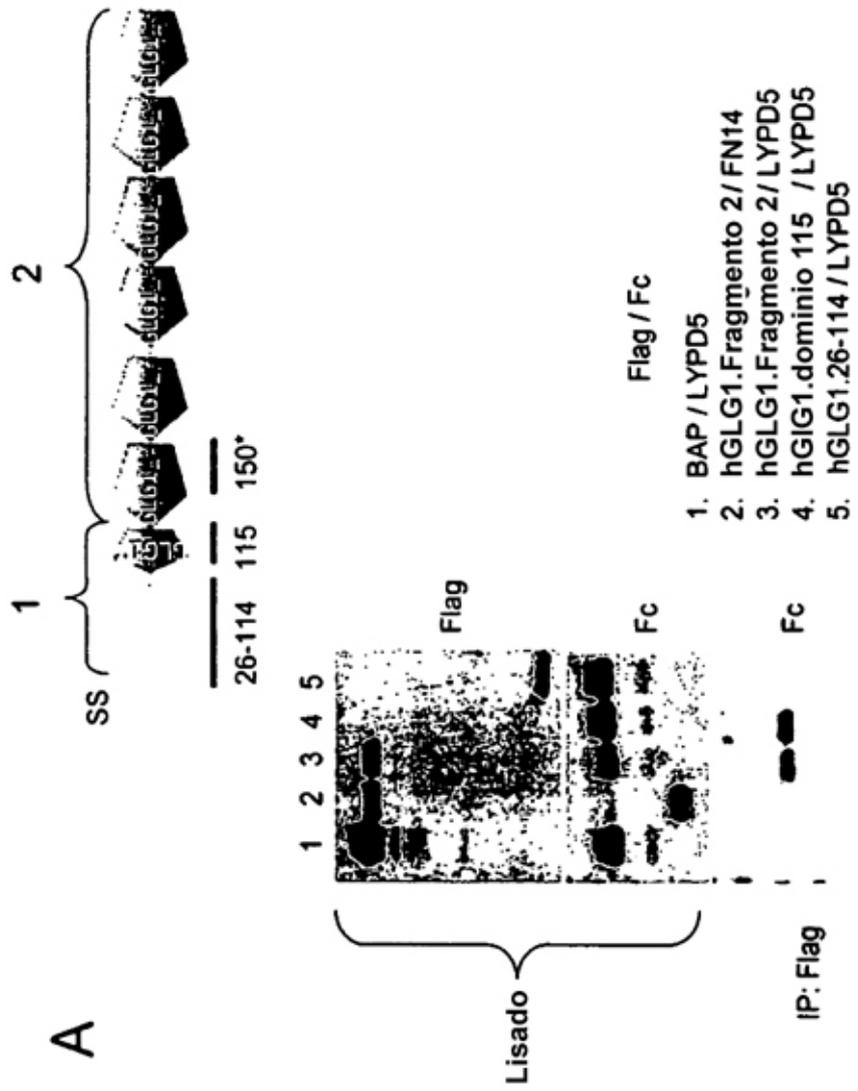


Figura 35

cgllgclgtc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagtctgact
 tgccccacag ccagtgagtg actgcagcag caccagaatc tggctcgttt cctgtttggc
 tcttclacca ctacggcttg ggatectggg catgggtgct ttgccaatgg tcttltttt
 gctgtctggc ctgagcagag gtgagagtga attggacgcc aagatccat ccacagggga
 tgccacagaa tggcgggaut ctacactgtc catgctgggg tctgcccagc cagccccctc
 ctgcccagaag tgcactctct cacaccccag ctgtgcatgg tgcaagcaac tgaacttcac
 cgcgtcggga gaggcggagg cgcggcgcctg cggccgacga gagagagctgc tggctcgagg
 ctgcccctg gaggagctgg aggagccccg cggccagcag gaggtgctgc aggaccagcc
 gctcagccag ggcgcccgcg gagaggggtgc caccagctg gcgccgacg gggctccgggt
 cacgtctcgg cctggggagc cccagcagct ccaggctccg tcttctctg ctgaggggata
 cccgttggac ctgtactacc ttatggacct gagctactcc atgaaggac accitggaacg
 cgtgcgcccag ctgaggcagc ctctgctggt ccggctgcag gaagtcacc attctgtgcg
 cattgtttt ggttctttt tggacaaaac ggtgctgccc ttgtgagca caglacctc
 caaactgccc caccctgccc ccacccggct ggagcgtctg cagtcacat tcaacttca
 ccatgtctg tccctgacgg gggacgcaca agccttcgag cgggaggtgg ggcgcccagag
 tgttcccggc aacttgact cgcctgaagg tggcttcgat gccattctg aggctgact
 ctgcccagag cagattggct ggagaaatgt gtcccggctg ctggtgtca ctcagacga
 cacattccat acagctgggg acgggaagt tggcggcatt tcatgcca gtgatggga
 ctgcccctg gacagcaat gcctctacag tgcagcaca gattttgact accctctgt
 ggtcaggtg gccagggccc tctctcagc aaatatccag cccatcttg ctgtaccag
 tgccgactg cctgtctacc aggagctgag taaactgatt cctaagtctg cagtgggga
 gctgagtgag gactccagca acgtgttaca gctcatcatg gatgttata atagctgtc
 ttccaccgtg accctgaac actcttact cctctctggg gtccacatt ctacgaac
 ccagltgtg ggtcttgaga agagggaggg taaggctgag gatcgaggac agtgcaacca
 cgtccgaac aaccagacgg tgcattctg ggttctct caagccacc actgctccc
 agagccccat ctctgagc tccggggccc tggcttctca gaggagctga ttgtggagt
 gcacacgctg tgtactgta attgcagtga caccagccc caggctccc actgcagtga
 tggccagggg cactacaat gtgggtatg cagctgtgcc cctggccc taggtcggct
 ctgtgagtc tctgtgcag agctctct cccagacctg gaactgggt gccgggctcc
 caatgycaca gggccccigt gcagtggaaa gggctactgt caatgtggac gctgcagctg
 cagtggacag agctctgggc atctgtcga gtgtgacgat gccagctgt agcgacatga
 gggcatctc tgcggaggct ttgctcgtg ccaatgtgga gtatgtact gtcagccaa
 ccgcacgggc agagcatcg aatgcagtgg ggacatggac agttgcatca gtcccaggg
 agggctctg agtgggcatg gacgctgcaa atgcaaccgc tgcagtgct tggacggcta
 ctatggctc ctatgcgacc aatgccaggg ctgcaagaca ccatgcgaga gacaccggga
 ctgtcagag tgtggggcct tccagactgg cccactggcc accaactgca gtacagctg
 tgcccatacc aatgtgccc tggccttggc cctatcttg gatgatggt ggtgcaaga
 gcgaccctg gacaaccagc tgttctct ctgtgtggag gatgacgcca gaggcacggt
 cgtgctcaga gtgagcccc aagaaaagg agcagaccac acgaggcca ttgtctggg
 ctgctaggg ggcactgtg cagtggggct ggggctgtc ctggctacc ggctctggg
 ggaatctat gaccgggg aatcacgctg ctgtgagaag gagcagcaac aactcaactg
 gaagcaggac agtaactct tctacaaaag tgcctcacg accacatca atctctgtt

Figura 36A

tcaggagga gacagtcca ctctctgaag gagggagga cacttaccca aggctctct
ccttgaggga cagtgggaac tggagggtga gaggaagggt gggctctgtaa gaccttgga
ggggactaat tcactggcga ggtgcggcca ccacctact tcatttcag agtgacacc
aagagggtg ctcccatgc ctgcaacctt gcatccatct gggctacccc acccaagtat
acaataaagt cttaccicag aaaaaaaaa aaaaaaaaa

Figura 36A (continuación)

MVALPMVLVLLLVL SRGEELDAKIPSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHP
SCAWCKQLNFTASGEAEARRCARREELLARGCPLEEELEPRGQQEVLQDQPLSQGARG
EGATQLAPQRVVRVTLRPGEPQQLQVRFLRAEGYPVDLYYLMDSLYSMKDDLRLVRQL
GHALLVRLQEVTHSVRIJGFGSFVDKTVLPFVSTVPSKLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSL
TGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPGGFDAILQAALCQEIQWRNVSRLLVFTSDDTFHT
AGDGKLGIFMPDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPSVGQVAQALSAANIPIFAVTSAAAL
PVYQELSKLIPKSAVGELSESSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLHSSLPPGVHISYESQCEG
PEKREGKAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLC
DCNCSDTQPQAPHCSDGQGHLCQGVCSCAPGRLGRLCECSVAELSSPDLESGCRAPNGT
GPLCSGKGHCQCGRCSCSGQSSGHLCECDDASERHEGILCGGFGRQCQGVCHCHANR
TGRACECSGDMDCISPEGGLCSGHGRCKCNRCQCLDGYYGALCDQCPCGCKTPCERHR
DCAECGAFRTGPLATNCSTACAHTNVTALAPILDDGWCKERTLDNQLFFFLVEDDAR
GTVVLRVRPQEKGADHTQAIVLGCVGGIVAVGLGLVLAYRLSVEIYDRREYSRFEKEQQ
QLNWKQDSNPLYKSAITTTINPRFQEADSPTL

Figura 36B