



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 631**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **94928141 .4**

(96) Fecha de presentación : **15.09.1994**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0719329**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.1996**

(54)

Título: **Receptor humano H4-1BB.**

(30)

Prioridad: **16.09.1993 US 122796**

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.06.2010

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.06.2010

(73)

Titular/es: **Indiana University Research and
Technology Corporation
351 West 10th Street
Indianapolis, Indiana 46202, US**

(72)

Inventor/es: **Kwon, Byoung S.**

(74)

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 341 631 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

Receptor humano H4-1BB.

5 La presente solicitud es una continuación en parte de la solicitud, en tramitación con la presente, con N° de serie 08/012.269, presentada el 1 de febrero de 1993, que es continuación en parte de la solicitud, en tramitación con la presente, con N° de serie 07/922.996, presentada el 30 de julio de 1992, que es continuación en parte de la solicitud, en tramitación con la presente, con N° de serie 07/267.577, presentada el 7 de noviembre de 1988.

10 El objeto descrito en el presente documento fue en parte una invención objeto de las ayudas gubernamentales de los NIH N°s IR23AI23058-03, RO1 AI28175 y P60 KD20542, de las cuales el presente inventor fue el Investigador Principal y el Beneficiario fue o la Donald Guthrie Foundation for Medical Research Inc., de Guthrie Square, Sayre, Pensilvania 18849-1669 o la Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana, de Indianápolis, Indiana 46202.

15 **Campo de la presente invención**

La presente invención versa acerca de una proteína receptora humana previamente desconocida, H4-1BB, que fue aislada e identificada con base en el trabajo con una proteína receptora homóloga murina (de ratón), 4-1BB, que fue aislada e identificada mediante expresión específica de los genes de las células T por el presente inventor.

Antecedentes de la presente invención

25 El sistema inmunitario de los seres humanos y de otras especies requiere que los glóbulos blancos se fabriquen en la médula ósea, glóbulos blancos que incluyen fagocitos, linfocitos y células B. Según se entiende en la actualidad, los fagocitos incluyen células macrófagas que eliminan del sistema materiales no deseados, como proteínas víricas. Los linfocitos incluyen células T colaboradoras y células T y células B asesinas, al igual que otras células, incluyendo las catalogadas como células T supresoras. Las células B producen los anticuerpos. Las células T asesinas atraviesan físicamente la célula y las células T colaboradoras facilitan todo el proceso. En cualquier circunstancia, el proceso inmunitario es facilitado por las linfocinas.

30 Las linfocinas son las proteínas mediante la cual las células inmunitarias se comunican entre sí. Los científicos las producen en cantidades suficientes para su uso terapéutico contra enfermedades inmunológicas. Hay muchas proteínas de linfocinas conocidas, e incluyen los interferones, la interleucina-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, factores estimulantes de colonias, la linfoxina, el factor de necrosis tumoral y eritropoyetina, al igual que otras.

La interleucina 1, segregada por los macrófagos, activa las células T colaboradoras y eleva la temperatura corporal, causando fiebre, lo que potencia la actividad de las células inmunitarias. Las células T colaboradoras activadas producen interleucina 2, y la interleucina 2 estimula las células T colaboradoras y asesinas para que crezcan y se dividan. Las células T colaboradoras también producen otra linfocina, el factor de crecimiento de las células B (FCCB), que hace que las células B se multipliquen. Según aumenta el número de células B, las células T colaboradoras producen otra linfocina, conocida como factor de diferenciación de las células B (FDCB), que da instrucciones a algunas de las células B para que dejen de replicarse y empiecen a producir anticuerpos. Las células T también producen una linfocina, el interferón (IF) gamma, que tiene múltiples efectos, como la interleucina 2. El interferón contribuye a activar las células T asesinas, capacitándolas para atacar a los organismos invasores. Como el FCCB, el interferón aumenta la capacidad de las células B para producir anticuerpos. El interferón también afecta a los macrófagos para mantenerlos en el lugar de la infección y ayuda a los macrófagos a digerir las células que han rodeado. Cobrando auge con cada tipo de señal de las linfocinas entre los macrófagos y las células T, las linfocinas amplifican la respuesta del sistema inmunitario y la proteína vírica u otra materia extraña en las células infectadas se ven arrolladas. Hay muchas otras linfocinas, quizá cien o más, que participan en el proceso inmunológico. Muchas linfocinas son conocidas; otras muchas no lo son.

55 Las linfocinas son denominadas a veces señales peptídicas intercelulares. Entre los científicos existe un uso generalizado de líneas celulares clonadas como productoras de linfocinas, y el aislamiento de ARNm de linfocina se ha convertido en una técnica común. La proteína receptora 4-1BB de ratón fue aislada e identificada con base en la expresión específica de los genes de células T usando una técnica identificada por el presente inventor en una publicación (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 2896-2900, mayo de 1987, Immunology and Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1963-1967, marzo de 1989, Immunology). El protocolo documentado en esa publicación puede ser usado por los científicos para detectar casi todas las linfocinas. El procedimiento está diseñado para detectar casi todo el ARNm expresado de modo diferencial, y las secuencias de ARNm de las células inmunitarias están expresadas diferencialmente (en cuanto a su relación con las células T y las células T asesinas) aunque el nivel de expresión sea bajo y la cantidad de la proteína de linfocina segregada sea reducida. El presente inventor cree que el análisis descrito en la publicación identificada previamente puede revelar moléculas importantes biológicamente, como las linfocinas, porque hay muchas indicaciones de que las moléculas importantes biológicamente o activas son codificadas mediante los mensajes más escasos. Un ejemplo de es un factor de transformación del crecimiento (FTC) que está presente como únicamente uno de un millón de clones.

Clásicamente, la mayoría de los factores de las células T han sido identificados reconociendo las actividades biológicas en los ensayos, purificando la información proteínica. Un enfoque alternativo es aislar los genes putativos de las células T con base en la expresión específica y, a continuación, demostrar la función de la molécula desconocida. Usando el procedimiento de rastreo diferencial modificado mencionado anteriormente, el presente inventor clonó una serie de ADNc específicos a un subconjunto de células T a partir de células T colaboradoras clonadas (HTL) L2 y de linfocitos T citolíticos clonados (LTC) L3.

Se aisló una serie de ADNc específicos a un subconjunto de células T a partir de células T murinas empleando un procedimiento de rastreo diferencial modificado. Se han documentado la secuencia de nucleótidos y las propiedades de expresión de algunas de las especies de ADNc. Se estudió adicionalmente uno de los genes no caracterizados previamente, que codifica la proteína receptora 4-1BB del ratón (Pollok *et al.*, J. Immunol. 150, 771-781, febrero de 1993, y Kim *et al.*, J. Immunol. 151, 1255-1262, agosto de 1993). Estos estudios han llevado al aislamiento del homólogo humano del 4-1BB, H4-1BB.

Resumen de la presente invención

La presente invención incluye la proteína receptora humana H4-1BB que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1 y un ADNc que codifica dicha proteína receptora humana H4-1BB que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1. La secuencia de nucleótidos de tal ADNc aislado es dada a conocer en el presente documento (ID SEC N° 1), junto con la secuencia deducida de aminoácidos. El gen de ADNc, identificado como pH4-1BB, fue depositado en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola y se le asignó el número de entrada NRRL B21131.

La presente invención también se relaciona con lo siguiente:

un ADN aislado obtenible mediante amplificación por RCP del ADNc de la invención usando el oligonucleótido 5' AAT AAG CTT TGC TAG TAT CAT ACC T 3' como cebador directo y el oligonucleótido 5' TTA AGA TCT CTG CGG AGA GTG TCC TGG CTC 3' como cebador inverso;

una proteína receptora H4-1BB obtenible

- a) insertando el ADNc de la invención en un vector de expresión apropiado,
- b) transfectando dicho vector de expresión en un anfitrión de transfección apropiado,
- c) cultivando dichos anfitriones transfectados en un medio de cultivo apropiado y
- d) purificando la proteína receptora de dicho medio de cultivo;

un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB que reconoce específicamente la proteína receptora H4-1BB, en el que el H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1;

un hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB que reconoce específicamente la proteína receptora H4-1BB, en el que el H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1;

un procedimiento *ex vivo* para potenciar la proliferación de células T que comprende la etapa de tratamiento de células T que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB con el anticuerpo monoclonal de la invención;

una proteína de fusión que comprende:

- a) la porción extracelular de la proteína receptora H4-1BB; y
- b) una proteína de detección,

en la que el H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1;

un procedimiento de detección de los ligandos de la membrana celular a la proteína receptora H4-1BB que comprende:

- a) proporcionar una proteína de fusión que incluye:
 - 1) la porción extracelular de dicha proteína receptora H4-1BB, y
 - 2) una proteína de detección ligada a dicha porción de dicha proteína receptora H4-1BB, de modo que el enlace de ligandos pueda detectarse mediante ensayos de actividad relativa para dicha proteína de detección;

- b) situar dicha proteína de fusión en presencia de una célula de la que se sospecha que expresa dichos ligandos de la membrana celular;
- c) lavar dicha célula de cualquier proteína de fusión no ligada a dichos ligandos de la membrana celular;
- d) situar dicha célula lavada en presencia de un sustrato para dicha proteína de detección y medir la actividad relativa de dicha proteína de detección,

en el que el H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1; y

un procedimiento *ex vivo* de inducción de la proliferación de células B que comprende la etapa de tratar las células B que tienen expresado un ligando a la proteína receptora H4-1BB con células que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB, en el que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

El ADNc puede usarse como sonda para aislar secuencia de ADN que codifican proteínas similares a la proteína receptora codificada por el ADNc. El ADNc del receptor humano H4-1BB es análogo en aproximadamente el 65% al ADNc del 4-1BB de ratón, y fue aislado usando sondas derivadas del ADNc del 4-1BB. El gen del ADNc identificado como p4-1BB fue depositado en la Colección de Tipos de Cultivo Estadounidenses, sita en 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, con el N° ATCC 67825.

La proteína receptora humana H4-1BB puede producirse: a) insertando el ADNc del H4-1BB en un vector de expresión apropiado, b) transfectando dicho vector de expresión en un anfitrión de transfección apropiado, c) cultivando los anfitriones transfectados en un medio de cultivo apropiado y d) purificando la proteína receptora de dicho medio de cultivo. La proteína puede ser usada: 1) como una sonda para aislar ligandos a la proteína receptora humana H4-1BB, 2) para estimular la proliferación de células B que expresan ligandos H4-1BB, o 3) para bloquear el enlace de ligandos H4-1BB.

La proliferación de células B puede ser inducida tratando células B que tienen expresado un ligando a la proteína receptora H4-1BB con células que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB. El uso de H4-1BB para bloquear el enlace de ligandos H4-1BB tiene aplicación práctica en la supresión del sistema inmunitario durante el trasplante de órganos. Se está analizando para este tipo de aplicación una red coestimuladora similar del sistema inmunitario. Véanse "Mounting a Targeted Strike on Unwanted Immune Responses", Jon Cohen, *Science*, Vol. 257, 8-7-92; "Long Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by CTLA4Ig", Lenschow *et al*, *Science* Vol. 257, 7-8-92; e "Immunosuppression *in Vivo* by a Soluble Form of the CTLA-4 T Cell Activation Molecule", Linsley *et al*, *Science* Vol. 257 7-8-92.

Puede usarse un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB para potenciar la proliferación de células T tratando células T que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB con el anticuerpo monoclonal anti H4-1BB. Algunos tumores son potencialmente inmunogénicos, pero no estimulan una respuesta antiinmunitaria *in vivo*. Los tumores pueden ser capaces de entregar señales específicas de antígenos a las células T, pero es posible que no entreguen las señales coestimuladoras necesarias para la plena activación de las células T. Se encontró que la expresión del ligando coestimulador B7 en células de melanoma inducía el rechazo *in vivo* de un melanoma murino ("Tumor Rejection After Direct Co-Stimulation of CD8+ T Cells by B7-Transfected Melanoma Cells", Sarah E. Townsend y James P. Allison, *Science* Vol. 259, 1-5-93). Según se sabe ahora, un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB puede ser capaz del mismo efecto para inducir la proliferación y la activación de las células T.

Se desarrolló una proteína de fusión para detectar ligandos de membrana celular a la proteína receptora humana H4-1BB. Comprende la porción extracelular de la proteína receptora H4-1BB y una proteína de detección (fosfatasa alcalina) enlazada a la porción de la proteína receptora H4-1BB. La porción de la proteína receptora H4-1BB se enlaza a los ligandos de la membrana celular, y el enlace puede ser detectado mediante ensayos de actividad relativa para la proteína de detección. La proteína de fusión es puesta en presencia de una célula de la que se sospecha que expresa la proteína receptora H4-1BB. A continuación, le célula se lava de cualquier proteína de fusión no enlazada a los ligandos de la membrana celular. Una vez que han sido lavadas, las células se sitúan en presencia de un sustrato para la proteína de detección y puede medirse la actividad relativa de la proteína de detección.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia del ADNc de la proteína receptora 4-1BB de ratón y las regiones usadas como cebadores de PCR para obtener la homóloga humana, H4-1BB.

Las Figuras 2a y 2b muestran, respectivamente, la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del receptor humano H4-1BB.

Las Figuras 3a y 3b ilustran las moléculas involucradas en la activación de las células T.

Las Figuras 4a, 4b y 4c ilustran una red normal de activación de células T.

Las Figuras 5a, 5b y 5c ilustran, respectivamente, el uso de CTLA4-1g solo, 4-1BB/FA y CTLA4-1g juntos, y 4-1BB/FA solo para bloquear etapas en la red de activación de células T.

Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada se hacen referencias a procedimientos y a estudios conocidos, así como al trabajo publicado del solicitante. Estas publicaciones son incorporadas en el presente documento por referencia en ras de la claridad y se enumeran en un apéndice incluido al final de esta descripción detallada.

Aislamiento y caracterización del receptor 4-1BB de ratón

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia deducida de aminoácidos del receptor 4-1BB de ratón. Los nucleótidos de la cadena del mensaje están numerados en la dirección de 5' a 3', y se muestran los números en ambos lados de la secuencia. El residuo nucleotídico 1 es la A del codón de iniciación ATG, y los nucleótidos en el lado 5' del residuo 1 están indicados mediante números negativos. La secuencia predicha de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia de nucleótidos. Se subraya el péptido putativo de la señal. El codón de terminación se indica por (---). Se resaltan con puntos los residuos de cisteína. Una característica inusual de la secuencia de 4-1BB es que existe señal potencial de poliadenilación de AATAAA en los nucleótidos 1158-1163 (enmarcados en la Fig. 1). Se creía que esta señal era funcional, porque este gen produce al menos dos tamaños diferentes de ARNm.

El transcrito de 4-1BB era inducible por concanavalina A en esplenocitos, clones de células T e hibridomas de ratón. La expresión de los transcritos de 4-1BB era inhibida por ciclosporina A. El ARNm de 4-1BB era inducible por estimulación del receptor de antígenos, pero no era inducible por estimulación con IL-2 en las células T clonadas (1). El ADNc de 4-1BB codifica un péptido de 256 aminoácidos que contiene una secuencia líder putativa, un segmento potencial de anclaje de membrana y otras características de proteínas receptoras conocidas. Por lo tanto, el patrón de expresión de 4-1BB se parece a los de los ARNm de linfocinas, aunque la secuencia parecía coherente con las de las proteínas receptoras.

La especie fundamental de 4-1BB en la superficie celular parece ser un dímero de 55 kDa. Parece que el 4-1 BB existe también como un monómero de 30 kDa y posiblemente como un tetramero de 110 kDa. Dado que estas especies de 4-1BB fueron inmunoprecipitadas a partir de una población homogénea de células (clon F1 de la célula T), todas las formas coexisten potencialmente en cada célula. Será necesaria una comparación de digestos peptídicos del monómero y del dímero de 4-1BB para determinar si existe 4-1BB como homodímero en la superficie celular. Una variedad de receptores de la superficie celular, tales como el receptor de la insulina (2), el receptor de la inmunoglobulina de la superficie de las células B (3), el receptor de Ag de las células T (4), el receptor coestimulador CD28 (5) y el antígeno CD27 de las células T (6), está compuesta de subunidades enlazadas con bisulfuro. Puede requerirse la dimerización de los receptores para el enlace de los ligandos y la señalización química subsiguiente.

El 4-1BB no está expresado en células T en reposo, pero es inducible mediante activadores, que entregan un estímulo al crecimiento completo de la célula T. La combinación de APM y ionomicina es capaz de imitar las señales requeridas para la proliferación de células T. Aunque el APM o la ionomicina por sí solas inducían el ARNm del 4-1BB, la combinación de APM y ionomicina resultó en una expresión óptima de 4-1BB. Además, la expresión de 4-1BB no fue transitoria. Cuando se estimularon con anti-CD3 inmovilizado células T esplénicas purificadas, se expresó el ARNm de 4-1BB y esta expresión se mantuvo hasta 96 horas después de la estimulación. Se requerirá el análisis del ciclo celular para confirmar que se expresa 4-1BB en todo el transcurso del ciclo celular.

El 4-1BB está relacionado estructuralmente con miembros de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso. Aunque estos receptores poseen estructuralmente propiedades similares de enlace de los ligandos (regiones ricas en cisteína), no son conservados los dominios citoplasmáticos de estas proteínas que podrían permitir la diversidad en la señalización transmembránica. Algunos miembros de esta familia están implicados en el proceso de activación de las células T o B. Existen datos funcionales *in vitro* sobre los antígenos OX-40, CD40 y CD27. Los anticuerpos contra el OX-40 aumentan la respuesta de las células T en una reacción de linfocitos mixtos (7), y los anticuerpos contra el CD40 potencian la proliferación de células B en presencia de un coactivador, como anticuerpos APM o CD20, y se sinergizan *in vitro* con IL-4 para inducir la diferenciación de las células B y generar líneas celulares de células B normales de larga duración (8). Un anticuerpo monoclonal, el anti-1A4, que reconoce un epítopo en la molécula de CD27, inhibió la movilización del calcio, la secreción de IL-2, la función de las células T colaboradoras y la proliferación de células T. Por otra parte, el CLB-CD27/1, otro AcM anti-CD27, potenció la proliferación de células T humanas con PHA o AcM anti-CD27 (6). Estos resultados indican que la molécula de CD27 desempeña un papel importante en la activación de las células T. Salvo para los RFNT, el NCFR y la CD40, los ligandos o moléculas de la superficie celular a las que se enlazan los miembros de la superfamilia no están aún identificados. La identificación y la caracterización de los ligandos a los cuales se enlazan los receptores serán útiles para definir mejor el papel fisiológico del 4-1BB.

Para tener la certeza de si el 4-1BB de la superficie celular pudiera contribuir a la activación de las células T, se usó el 53A2 anti-4-1BB como antagonista del 4-1BB. Estos datos sugirieron que, de hecho, el 4-1BB sí tiene el potencial de funcionar como molécula señalizadora accesoria durante la activación y la proliferación de las células T. La adición de 53A2 soluble a células T esplénicas purificadas estimuladas con anti-CD3 inmovilizado dio como resultado una amplificación de la incorporación de timidina ³H en comparación con células T estimuladas únicamente con anti-CD3. Este patrón de potenciación osciló de 2 a 10 veces en tres experimentos independientes.

En el modelo original de dos señales de Bretcher y Cohn, proponían que la señal 1, la ocupación del receptor de antígenos de la célula T (RCT), daba como resultado la inactivación de la célula T en ausencia de la señal 2, que es proporcionada por células accesorias. Esto ha sido confirmado por una variedad de estudios (9). La identificación de la célula accesoria CD28 como potente receptor coestimulador en las células T fue una aportación significativa en el comienzo de la caracterización de la(s) señal(es) accesoria(s) requerida(s) para la proliferación óptima de las células T (10). Es posible que otras moléculas de la superficie celular puedan contribuir a estos requisitos de activación coestimuladora (11).

Las señales bioquímicas entregadas mediante el 4-1BB no son completamente conocidas. Una posibilidad considerada fue la observación de que el 4-1BB contiene un dominio de enlace putativo de tirosina quinasa p56^{kk} en su cola citoplasmática. Más tarde se determinó que la tirosina quinasa p56^{kk} se enlaza con el 4-1BB. También merecerá la pena determinar si la señalización mediada por el 4-1BB puede regular genes como la IL-2 el receptor de IL-2, cuya expresión se requiere para la activación de las células T y su subsiguiente proliferación.

Aunque las funciones precisas de los miembros de la familia de Receptores del Factor de Crecimiento Nervioso (RFCN) parecen ser diversas, un tema emergente es aquel en el que estas moléculas pueden contribuir de diversas maneras a un mantenimiento de la capacidad de respuesta o la viabilidad de las neuronas *in vitro* e *in vivo* (12). La reticulación de la CD40 mediante anticuerpo monoclonal anti-CD40 impide que los centrocitos del centro germinal sufran apoptosis *in vitro* (13). Las señales entregadas por el CD40 pueden también contribuir al mantenimiento de la capacidad de respuesta a factores diferenciadores. La ligación del CD40 con fragmentos F(ab')₂ anti-CD40 en presencia de IL-4 indujo grandes incrementos en la síntesis de IgE (14). Además, las células B no tratadas previamente activadas con anti-CD40 tratadas con IL-10 y el factor de transformación del crecimiento β se dedicaron a la secreción de IgA (15).

Además de compartir las características moleculares con la superfamilia RFCN, se observó que el 4-1BB contenía una estructura putativa de dedo de cinc de la proteína eIF-2 β de las levaduras (16). El 4-1BB también comparte una región conservada con el siete *in absentia* (sina) de *Drosophila*, que se requiere para el correcto desarrollo de las células fotorreceptoras (17). Esa región particular es también similar al producto proteínico del gen DG17 de *Dictyostelium*, cuya expresión es inducida específicamente durante la agregación mediante AMFc (18).

Esta región forma el patrón de C-X₂-C-X₉-C-X₃-H-X₃-C-X-C; y las cisteínas y la histidina se conservan en un espacio similar en las proteínas 4-1BB, sina, y DG17. Diez de los 24 aminoácidos entre las proteínas 4-1BB y sina son idénticos, y 3 de los 24 son sustitutos conservadores. El patrón conservado sugiere que estos aminoácidos son funcionalmente importantes. La proteína sina está localizada en el núcleo, lo que sugiere que tiene una función reguladora en las células. El hecho de que la secuencia de aminoácidos del 4-1BB contenga características como el motivo del dedo de cinc, una proteína nuclear y un dominio receptor sugiere que el 4-1BB puede desempeñar papeles diversos durante la proliferación y la diferenciación celulares.

El 4-1BB puede representar otra molécula de la superficie celular implicada en las interacciones entre las células T y las CPA. La proteína de fusión 4-1BB-FA se enlaza específicamente con líneas de células B maduras, células B primarias activadas con anti-P, y líneas celulares de macrófagos maduros. La 4-1BB-FA se enlaza a niveles reducidos o insignificantes con líneas celulares inmaduras B y de macrófagos, clones de células T, células T primarias de cultivo y diversas líneas celulares no linfoides. Dado que la 4-1BB-FA se enlaza con células B y macrófagos maduros, es posible que las señales entregadas con el enlace de 4-1BB puedan modular de alguna manera las funciones de las CPA. Esta posibilidad sigue pendiente de estudio.

Chalupny y sus colegas (19) han propuesto que la 4-1BB Rg, una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular de 4-1BB y la región Fc de la IgG humana, se enlaza con matriz extracelular (MEC). El nivel más elevado de enlace de 4-1BB Rg fue con la vitronectina humana. En datos no mostrados, se realizó un ensayo ELISA usando 4-1BB-FA y vitronectina humana (Yelios Pharmaceuticals/GIBCO-BRL, Grand Island, Nueva York) inmovilizada a 0,007 μ g-10 μ g por pocillo en placas de microtitración. No se observó ningún enlace de la 4-1BB-FA basado en la actividad de la FA. Para descartar la posibilidad de que la 4-1BB-FA se estuviera enlazando con proteínas unidas extrínsecamente a la superficie celular (posibles componentes de la matriz extracelular), se lavaron linfomas de células B en condiciones ácidas antes del ensayo en enlace. La 4-1BB-FA siguió enlazándose específicamente a linfomas de células B maduras. Queda por determinar si existe un ligando 4-1BB expresado específicamente en células B y macrófagos, y si la 4-1BB-FA puede enlazarse con la MEC bajo condiciones de enlace particulares. Es posible que la MEC pudiera facilitar el enlace de 4-1BB con un ligando específico de la superficie celular.

Las células B y las células T colaboradoras interactúan entre sí mediante receptores en las células B que se enlazan con sus contrarceptores específicos en las células T. Se cree que esta interacción da como resultado una cascada de relevos de señalización bioquímica entre estos dos tipos de células (20). Según prosigue esta interacción, estas células se dedican a entrar en la fase S del ciclo celular. Las interacciones iniciales entre RCT y CD4 en las células T, y de los antígenos de CPH II procesados en las células B, no dan como resultado células B capaces de entrar en el ciclo celular (21). Sin embargo, los estudios de sistemas *in vitro* sugieren que, una vez que las células T son estimuladas, expresan nuevas moléculas de la superficie celular sintetizadas o modificadas capaces de inducir a las células B a entrar en el ciclo celular (22, 23). Esta función de las células T no es específica para un antígeno ni restringida al CPH (24). Además, no se requieren factores solubles para la inducción activada con Th de la activación de las células B (25). Una vez que las células B entran en el ciclo celular, la IL-4 induce a las células B a progresar de la fase G₁ a la S.

La capacidad de las células T activadas o de las membranas de las células T para promover la entrada de las células B en el ciclo celular puede ser bloqueada mediante tratamiento o bien de cicloheximida o bien de ciclosporina A (26, 27). Estas proteínas de la membrana nuevas expresadas parecen ser semejantes a las linfocinas en sus características de inducción.

El 4-1BB tiene propiedades de expresión que satisfacen los requisitos de un coestimulador de células B. El 4-1BB es inducible por estimulación de células T inducida por anti-CD3 o RCT, y su expresión es sensible a la ciclosporina A, al igual que al tratamiento con cicloheximida (28). Resulta interesante que las células SF21-4-1BB fijadas con paraformaldehído, se sinergizaran con anti-P al inducir la proliferación de células B. La coestimulación de células B esplénicas mediante SF21-4-1BB ocurrió con dosis óptimas (10 $\mu\text{g/ml}$) y subóptimas (1,0-0,1 $\mu\text{g/ml}$) de anti-P. La adición de células SF21-4-1BB a células B en reposo no resultó en una proliferación significativa de células B. Las células SF21-4-1BB no se sinergizaron con TPA ni ionomicina, ni con concentraciones subóptimas de LPS al inducir la proliferación de células B.

Aunque se ha usado el sistema de baculovirus para expresar grandes cantidades de proteínas solubles recombinantes, este sistema puede utilizarse para la expresión de proteínas recombinantes de la superficie celular. La infección con baculovirus proporciona un medio conveniente para expresar niveles con uniformidad elevada de proteína recombinante célula a célula. Es digno de mención que la adición de células SF21 solas no diese como resultado niveles significativos de coestimulación. Este puede ser un problema potencial cuando se usan líneas celulares cos- o L- que pueden exhibir una fuerte actividad coestimuladora por sí solas.

La CD40, otro miembro de la superfamilia RFCN, se expresa en las células B e interactúa con gp39, una molécula expresada en las células T activadas. Se han clonado los ADNc que codifican las proteínas gp39 murina (29) y humana (30); esta molécula de la superficie celular es una proteína de membrana de tipo II con homología con el factor de la necrosis. Noelle *et al.* (31) hallaron que una proteína de fusión CD40-inmunoglobulina es capaz de bloquear la proliferación y la diferenciación de células B inducidas por células T de una forma que depende de la dosis. Armitage *et al.* han aislado un ADNc de la gp39 murina y mostraron que la gp39 podía inducir la proliferación de células B en ausencia de coestímulos, y dar como resultado la producción de IgE en presencia de IL-4-. Hollenbaugh *et al.* (32) han demostrado que las células con gp39 humana pueden sinergizarse o bien con TPA o anti-CD20 al inducir la proliferación de células B humanas y ser capaces de estimular las células B sin un coestimulador únicamente a niveles reducidos. Estos datos indican que la CD40 puede ser una de las moléculas de la superficie de las células B que transmiten señales durante el contacto físico con las células T.

Los receptores de la superficie celular se comunican con su medio externo interactuando ya sea con factores solubles o con otras moléculas de la superficie celular expresadas en células vecinas. El papel de las señales bioquímicas entregadas en el contacto célula a célula en contraposición con las entregadas mediante factores solubles que interactúan con los receptores de la superficie celular no está claro. La superfamilia RFCN es inusual, porque el RFNT I y el II, al igual que la RFCN, se enlazan con más de un ligando. Los RFNT I y II se enlazan ambos con el FNT- α y el FNT-R (33). El RFCN se enlaza con el FCN, el factor neurotrófico derivado del cerebro y la neurotrofina-3 (34).

Además, un ligando puede funcionar a la vez como superficie celular y como ligando soluble. La evidencia reciente sobre el ligando CD4-0, gp39, sugiere que este ligando puede existir como ligando enlazado a la membrana, al igual que como ligando soluble (35). Puede que sea posible que el 4-1BB se segregue e interactúe con las células B de una forma soluble, al igual que en forma ligada a la membrana. La CD27, un miembro de la familia de receptores RFCN, que es expresada en las células T, es segregada, además de estar expresada en la superficie celular (36). También es posible que más de 1 ligando (soluble y de la superficie celular) pueda enlazarse con el 4-1BB.

Aislamiento del homólogo humano, H4-1BB

Para aislar el homólogo humano (H4-1BB) del 4-1BB de ratón, se diseñaron dos juegos de cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Para diseñar cebadores RCP, se comparó la secuencia de aminoácidos entre los miembros de la superfamilia de Receptores del Factor de Crecimiento Nervioso (RFCN) porque el 4-1BB es miembro de la superfamilia (37). Las secuencias de aminoácidos empleadas fueron el 4-1BB de ratón (38), el RFCN humano (39), los receptores del factor de necrosis tumoral humana (33), la CD40 humana (40) y la CD27 humana (6). Se escogieron las áreas de conservación de la secuencia entre la superfamilia RFCN.

El cebador directo I (H4-1BBFI) abarca desde el aminoácido 36 al 41 y el cebador directo II (H4-1BBFII) abarca desde el aminoácido 52 al 58 del 4-1BB de ratón. El cebador inverso I (H4-1BBRI) abarca desde el aminoácido 116 al 121 y el cebador inverso II (H4-1BBRII) abarca desde el aminoácido 122 al 128 del 4-1BB de ratón. Las regiones usadas como cebadores de la RCP en el 4-1BB de ratón están indicadas en la Fig. 1.

ES 2 341 631 T3

La secuencia oligonucleótida redundante de cada cebador es como sigue:

```

5      H4-1BBFI:   5'   TTC   TGT   CGI   AAA   TAT   AAT   CC   3'
                        T     C     A     G     C     C
      H4-1BBFII:  5'   TTC   TCI   TCI   ATT   GGI   GGI   CA   3'
                        T     G     G     C
                        A
10     H4-1BBRI:   5'   CC     IAA   IGA   ACA   IGT   TTT   ACA   3'
                        G     CT   G     C     G
      H4-1BBRII:  5'   TT     TTG   ATC   ATT   AAA   IGT   ICC   3'

```

15 Se aislaron y activaron con APM (10 ng/ml) y los ionomicina (1 μ M) linfocitos de la sangre periférica de individuos normales sanos. Se aisló ARNm de los linfocitos. Usando transcriptasa inversa, se convirtió el ARNm de los linfocitos humanos en ADNc monocatenario. A continuación, el ADNc fue amplificado con polimerasa Taq con combinación de los cebadores. La combinación de los cebadores fue como sigue: H4-1BBFI frente a H4-1BBRI; H4-1BBFI frente a H4-1BBRII; H4-1BBFII frente a H4-1BBRI; y H4-1BBFII frente a H4-1BBRII.

20 El conjunto de cebadores de H4-1BBFII y H4-1BBRII produjo una banda específica de ~240 bp. Los 240 bp es el tamaño esperado del 4-1BB humano si la proteína homóloga humana es similar en tamaño al 4-1BB de ratón. El producto de la RCP (240 bp) fue clonado en un vector PGEM3 y secuenciado. Un marco de lectura abierta del producto de la RCP fue idéntico en ~65% al 4-1BB de ratón. El producto de la RCP de 240 bp se usó para cribar una
25 genoteca de ADNc del λ gt11 de linfocitos T humanos activados. Se aisló un ADNc de ~0,85 kb. La secuencia del ADNc se muestra en la Figura 2, y la secuencia de aminoácidos predicha se muestra en la Figura 2b. La información igual mostrada es el listado de secuencia adjunto a esta memoria en la id. de secuencia 1.

30 Se construyó un plásmido de expresión para producir la proteína de fusión H4-1BB-FA. Se amplificó mediante RCP la porción 5' del ADNc de H4-1BB, incluyendo las secuencias que codifican la secuencia de señales y todo el dominio extracelular. Para la clonación correctamente orientada, se crearon un sitio Hind III en el extremo 5' del cebador director y un sitio Bgl II en el extremo 5' del cebador inverso.

35 El fragmento Hind III - Bgl II H4-1BB fue insertado en el vector de expresión mamífera APTaq-1, aguas arriba de la secuencia de codificación de la fosfatasa alcalina (FA) placentaria humana. Los cebadores de la RCP de oligonucleótidos usados para la amplificación de la porción 5' del H4-1BB son como sigue:

Cebador directo: 5' AAT AAG CTT TGC TAG TAT CAT ACC T 3'

40 Cebador inverso: 5' TTA AGA TCT CTG CGG AGA GTG TCC TGG CTC 3'

Se usará H4-1BB-FA para identificar células y tejidos que expresan el ligando para el 4-1BB humano (es decir, el H4-1BBL). Los estudios con 4-1BB de ratón indicaron que el ligando para el 4-1BB está en la superficie celular. Las células B y los macrófagos eran células importantes que expresan el 4-1BBL. Cabe esperar que el H4-1BBL también
45 se exprese en células B y macrófagos humanos.

Se generará una genoteca de ADNc de expresión mamífera a partir de líneas celulares humanas que expresan H4-1BBL. La genoteca será cribada por H4-1BB-FA marcada con [¹²⁵] I. A continuación, se aislará y caracterizará el ADNc del H4-1BBL. Acto seguido, se producirá H4-1BBL recombinante soluble. Se usará tanto H4-1BB-FA como
50 H4-1BBL para suprimir o potenciar las respuestas inmunitarias, tal como se describe más abajo. Se producirá el anticuerpo monoclonal al H4-1BB y al H4-1BBL.

Conforme a los estudios con 4-1BB de ratón, el 4-1BB actúa como señal coestimuladora. Cabe esperar que el H4-1BB actúe como señal coestimuladora para la activación de las células T. El 4-1BB de ratón ayudó a las células B
55 con la proliferación y la diferenciación. Cabe esperar que el H4-1BB haga lo mismo. Pueden usarse H4-1BB-FA, H4-1BBL y el anticuerpo monoclonal para suprimir o potenciar las respuestas inmunitarias humanas.

Las Figuras 3a y 3b ilustran las moléculas implicadas en la activación de células T. Durante la activación inicial de las células T (fase cognitiva), las células T en reposo expresan el complejo RCT/CD3 y otras moléculas "accesorias".
60 Entre estas moléculas expresadas constitutivamente, CD4 (o CD8), LFA-1 y CD28 son probablemente las que reciben señales coestimuladoras. La interacción inicial con el complejo RCT/CD3 en combinación con estas señales coestimuladoras "accesorias" conduce a la expresión subsiguiente de moléculas receptoras adicionales, como CD28, CTLA4 y 4-1BB. Es probable que estas moléculas nuevas expresadas vayan a recibir importantes señales coestimuladoras adicionales en etapas posteriores de la activación de las células T (expansión clonal).

65 La entrada HUMILAX de la base de datos, Número de acceso L12964, versión de GI: 292237; 6.12.1993 describe un ADNc y su secuencia predicha de aminoácidos que difiere de la ID SEC N° 1 en un intercambio de aminoácidos.

Supresión de las respuestas inmunitarias

Las Figuras 4a-c ilustran una red normal de activación de células T. Las Figuras 5a-c ilustran el bloqueo de las respuestas inmunitarias con quimera soluble de 4-1BB. Si el 4-1BB desempeña un papel en la activación de las células T, el bloqueo de la interacción a su ligando en células presentadoras de antígeno debería dar como resultado la supresión de las respuestas inmunitarias dependientes de las células T. Está bien documentado que el bloqueo de la interacción de la CD28 con su contrarreceptor B7 suprime en distintos grados tanto la producción de anticuerpos *in vivo* como las respuestas inmunitarias mediadas por células. El bloqueo de ambas interacciones debería dar como resultado una inmunosupresión más efectiva, dado que el 4-1BB es inducido durante la activación de las células T. El bloqueo de la interacción de 4-1BB con su ligando puede ser de importancia en fases posteriores del proceso de activación en las que la interacción CD28/B7 pueda no ser ya de relevancia.

Tal como se ilustra anteriormente con el receptor 4-1BB de ratón y con el ligando 4-1BBL de ratón, la adición de H4-1BB-FA recubrirá las células que expresan el H4-1BBL y bloqueará la interacción normal entre H4-1BB y H4-1BBL. Esto conducirá a la inmunosupresión. Este tipo de inmunosupresión es específica al antígeno. Por lo tanto, evita la inmunosupresión generalizada producida por los tratamientos con anti-CD3 o ciclosporina A. El tratamiento con H4-1BB-FA puede usarse para tratar ciertas enfermedades autoinmunitarias y para facilitar el trasplante de órganos.

Potenciación inmunitaria

El H4-1BB puede actuar en la fase tardía de activación de las células T y puede ser una molécula vital para completar la activación de las células T. La mayoría de los tumores presentan antígenos específicos al tumor. Sin embargo, una razón por la que los tumores inmunogénicos pueden escapar del sistema inmunológico del anfitrión es que las células T reactivas contra el tumor reciben una coestimulación inadecuada. Por lo tanto, la introducción en el tumor de las moléculas coestimuladoras, como el H4-1BB, podría potenciar la inmunidad antitumoral de las células T citotóxicas (LTC). El H4-1BBL puede expresarse de forma específica a la célula. Por ejemplo, el H4-1BBL puede ser expresado en melanoma usando un promotor específico a los melanocitos, como los promotores de tirosinasa. El melanoma que expresa H4-1BBL estimulará células T citotóxicas mediante el H4-1BB y activará los LTC específicos al melanoma. Los LTC activados específicos al melanoma pueden destruir el melanoma.

Apéndice a referencias incorporadas por referencia

1. Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D. y Goodwin, R. G. 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019-1023.

2. Ebina, Y., L. Ellis, K. Jaruagin, M. Edery, L. Graf, E. Clauser, J. On, F. Marizrz, Y. W. Kan, J. D. Goldfine, R. A. Roth y W. J. Rutter, 1985, The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling, *Cell* 40:747.

3. Vassali, R., R. Tedghi, B. Listowska-Bernstein, A. Tartakoff y J. C. Jaton, 1979, Evidence for hydrophobic region within heavy chains of mouse B lymphocyte membrane-bound IgM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5515.

4. Haskins, K., R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. Kappler y P. Marrack, 1983, The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells I Isolation with monoclonal antibody, *J. Exp. Med.* 157:1149.

5. Lesslaver, W. y H. Gmunder, 1986, Biochemical characterization of the 9.3 antigens of human T-cells: simultaneous expression of disulfide-bonded 90-Kiladalton dimers and free subunits at the cell surface, *Mol. Immunol.* 23:271.

6. Van Lier, R., J. Borst, T. Vroom, H. Klein, P. Mourik, W. Zeijlemaker y C. Melife, 1987, Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27) a novel T cell differentiation antigen, *J. Immunol.* 139:1589.

7. Mallett, S., S. Fossum y A. Barclay, 1990, Characterization of the MRC 0X40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes-a molecule related to nerve growth factor receptor, *EMBO J.* 9:1603.

8. Banchereau, J., P. Paoli, A., Valle, E. García y F. Roussel, 1991, Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40, *Science* 251:70.

9. Moeller, D. L., M. K. Jenkins y R. H. Schwartz, 1989, Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a co-stimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy, *Ann. Rev. Immunol.* 7:445.

10. June, D. H., J. A. Ledbetter, P. S. Linsley y C. B. Thompson, 1989, Role of CD28 receptor in T cell activation, *Immunol. Today* 11:211.

11. **Yang, L., B. Jones, A. Aruffo, K. M. Sullivan, P. S. Linsley y C. A. Janeway, Jr., 1992**, Heat stable antigen is a co-stimulatory molecule for CD4 T cell growth, *J. Exp. Med.* 175:437.
12. **Yamori, T., 1992**, Molecular mechanisms for generation of neural diversity and specificity: roles of polypeptide factors in development of post-mitotic neurons, *Neurosci. Res.* 12:545.
13. **Liu, Y. J., D. E. Joshua, G. T. Williams, C. A. Smith, J. Gordon y I. C. M. MacLennan, 1989**, Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres, *Nature*, 342:929.
14. **Jabara, H. H., S. M. Fu, R. S. Geha y D. Vercelli, 1990**, CD40 and IF ϵ : synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells, *J. Exp. Med.* 172:1861.
15. **Defrance, R., B. Vanbervliet, F. Briere, I. Durnad, F. Roussle y J. Banchereau, 1992**, Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40 activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A, *J. Exp. Med.* 175:671.
16. **Donahue, T., Cigan, A., Pahich, E. y Valavicius, B., 1988**, Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 β gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process, *Cell* 54 (1988) 621-632.
17. **Carthew, R. W y Rubin, G. M., 1990**, *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye, *Cell*, 63 (1990) 561-577.
18. **Driscoll, D. M. y Williams, J. G., 1987**, Two divergently transcribed genes of *Dictyostelium discoideum* are cyclic AMP-inducible and coregulated during development, *Mol. and Cell. Biol.* 7 (1987) 4482-4489.
19. **Chalupny, N. J., Peach, R., Hollenbaugh, D., Ledbetter, J. A., Farr, A. G. y Aruffo, A., 1992**, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10360-10364.
20. **Noelle, R. J. y Snow, E. C., 1991**, *The FASEB J.* 5:2770-2776.
21. **Noelle, R. y Snow, E., 1990**, *Immunol. Today* 11:361 -368.
22. **Zurawski, G., Benedik, M., Kamb, B. J., Abrams, J. S., Zurawski, S. M. y Lee, F. D. (1986)** *Science* 232. 772-775.
23. **Kinachi, T. (1986)** *Nature* 325, 70-73.
24. **Gershengfeld, H. K. y Weissman, I. L. (1986)** *Science* 232,854-858.
25. **Biggin, M., Gison, T. y Hung, G. (1983)** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3963-3965.
26. **Hodgkin, P. D., Yamashita, L. C., Coffman, R. L. y Kehry, M. R., 1990**, *J. Immunol.* 145:2025-2034.
27. **Barlett, W. C., McCann, J., Shephaer, D. M., Roy, M. y Noelle, R. J., 1990**, *J. Immunol.* 145:3956-3962.
28. **Kwon, B. S., Kestler, D. P., Eshhar, Z., Oh, K. y Wakulchik, M. 1989**, Expression characteristics of two potential T cell mediator genes. *Cell. Immunol.* 121:414-422.
29. **Armitage, R., Fanslow, W., Strockbine, L., Sato, T., Clifford, K., MacDuff, B., Anderson, D., Gimpel, S., Davis-Smith, T., Maliszewski, C., Clark, E., Smith, C., Grabstein, K., Cosman, D. y Spriggs, M., 1991**, *Nature* 357:80-82.
30. **Kwon, B., Kestler, D., Lee, E., Wakulchik, M. y Young J. (1988)** *J. Exp. Med* (1988) (en la imprenta).
31. **Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd, D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. y Aruffo, A., 1992**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6550-6554.
32. **Hollenbaugh, D., Grosmaier, L. S., Kulas, C. D., Chalupny, N. J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R. J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. y Aruffo, A., 1992**, *EMBO* 11:4314-4321.
33. **Schall, T. J., M. Lewis, K. J. Koller, A. Lee, G. C. Rice, G. H. W. Wong, T. Gatanaga, G. A. Granger, R. Lentz, H. Raab, W. J. Kohr y D. V. Goeddel, 1990**, Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor, *Cell* 61:361.
34. **Klein, R., Nanduri, V., Jing, S., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F. y Barbacid, M., 1991**, *Cell* 66:395-403.

ES 2 341 631 T3

35. **Armitage, R. J., Sato, T. A., Macduff, B. M., Clifford, K. N., Alpert, A. R., Smith, C. A. y Fanslow, W. C.,** 1992, *Eur. J. Immunol.* 22:2071-2076.

36. **Hintzen, R. Q., de Jong, R., Hack, E. E., Chamuleau, M., de Vries, E. F. R., ten Berge, I. J. M., Borst, J. y**
5 **van Lier, R. A. W.,** 1991, *J. Immunol.* 147:29-35.

37. **Mallett, S. y Barclay, A. N.** 1991. A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunol. Today.* 12:220-223.

38. **Kwon, B. S. y Weissman, S. M.** 1989. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1963-1967.

39. **Johnson, D., Lanahan, A., Buck C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. y Chao, M.** 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554.

40. **Stamenkovic, I., Clark, E. y Seed, B.** 1989. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO. J.* 8:1403-1408.

REIVINDICACIONES

1. Un ADNc que codifica la proteína receptora H4-1BB que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

2. El ADNc de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de nucleótidos mostrados en la ID SEC N° 1.

3. El ADNc de la reivindicación 1, identificado como pH4-1BB, depositado en la Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola con el número de entrada NRRL B21131.

4. Un ADN aislado obtenible mediante amplificación por RCP del ADNc de la reivindicación 2 usando el oligonucleótido 5' AAT AAG CTT TGC TAG TAT CAT ACC T 3' como cebador directo y el oligonucleótido 5' TTA AGA TCT CTG CGG AGA GTG TCC TGG CTC 3' como cebador inverso.

5. La proteína receptora H4-1BB, obtenible

a) insertando el ADNc de las reivindicaciones 1, 2 o 3 en un vector de expresión apropiado,

b) transfectando dicho vector de expresión en un anfitrión de transfección apropiado,

c) cultivando dichos anfitriones transfectados en un medio de cultivo apropiado y

d) purificando la proteína receptora de dicho medio de cultivo.

6. La proteína receptora H4-1BB que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

7. Un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB que reconoce específicamente la proteína receptora H4-1BB, en el que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

8. Un hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal contra H4-1BB que reconoce específicamente la proteína receptora H4-1BB, en el que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

9. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7 para su uso como inmunosupresor o inmunoestimulante en seres humanos.

10. Un procedimiento *ex vivo* para potenciar la proliferación de células T que comprende la etapa de tratamiento de células T que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB con el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 7.

11. El procedimiento de la reivindicación 10 que comprende además la etapa de llevar a cabo dicho tratamiento en presencia de la proteína tirosinasa quinasa.

12. Una proteína de fusión que comprende:

a) la porción extracelular de la proteína receptora H4-1BB; y

b) una proteína de detección,

en la que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

13. La proteína de fusión de la reivindicación 12 en la que dicha proteína de detección es fosfatasa alcalina.

14. Un procedimiento de detección de los ligandos de la membrana celular a la proteína receptora H4-1BB que comprende:

a) proporcionar una proteína de fusión que incluye:

1) la porción extracelular de dicha proteína receptora H4-1BB, y

2) una proteína de detección ligada a dicha porción de dicha proteína receptora H4-1BB, de modo que el enlace de ligandos pueda detectarse mediante ensayos de actividad relativa para dicha proteína de detección;

b) situar dicha proteína de fusión en presencia de una célula de la que se sospecha que expresa dichos ligandos de la membrana celular;

ES 2 341 631 T3

- c) lavar dicha célula de cualquier proteína de fusión no ligada a dichos ligandos de la membrana celular;
- d) situar dicha célula lavada en presencia de un sustrato para dicha proteína de detección y medir la actividad relativa de dicha proteína de detección,

5

en el que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha proteína de detección es fosfatasa alcalina.

10

16. Un procedimiento *ex vivo* de inducción de la proliferación de células B que comprende la etapa de tratar las células B que tienen expresado un ligando a la proteína receptora H4-1BB con células que tienen expresada la proteína receptora H4-1BB, en el que la H4-1BB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID SEC N° 1.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

-145	CATGAAGTCC TGAGTGGATA AACAGGACCG GATATGCTG TGTAAAGCAA TATTACTACA CCAAGGAAAG	ATGTC	
-150	CACACATTCC ACAACAGGAA AGGAGCCCTCT CACAGAAAAC CACAGTGCC TGTGCATGTG ACATTTGGCC		
-70	ATG GGA AAC AAC TGT TAC AAC GTG GTG GTC ATT GTG CTG CTG CTA GTG GCG TGT GAG AAG	60	
1	Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val Gly Cys Glu Lys	20	
61	GTG GGA GCG GTG CAG AAC TCC TGT GAT AAC TGT CAG CCT GGT ACT TTC TGC AGA AAA TAC	120	
21	Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Glu Phe Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr	40	
121	AAT CCA CTC TGC AAG ACC TCC CCT CCA AGT ACC TTC TCC AGC ATA GGT GGA CAG CCC AAC	180	H4-IBBFL
41	Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Glu Pro Asn	60	
181	TGT AAC ATC TGC AGA GTG TGT GCA GCG TAT TTC AGG TTC AAG AAG TIF TGC TCC TCT ACC	240	H4-IBBFL
61	Cys Asn Ile Cys Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr	80	
241	CAC AAC GCG GAG TGT CAG TGC ATT GAA GGA TTC CAT TGC TTG GCG CCA CAG TGC ACC AGA	300	
61	Ile Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe Ile Cys Leu Gly Phe Glu Cys Thr Arg	100	
301	TGT GAA AAG GAC TGC AGG CCT GCG CAG CAG CTA ACG AAG CAG GGT TGC AAA ACC TGT AGC	360	
101	Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Glu Glu Leu Thr Lys Glu Gly Cys Lys Thr Cys Ser	120	
361	TTG GGA ACA TTT AAT CAC CAG AAC GGT ACT GCG GTC TGT CGA CCC TGC ACC AAC TCC TCT	420	H4-IBBFL
121	Leu Gly Thr Phe Asn Asp Glu Asn Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser	140	
421	CTA GAG GGA ACG TCT GTG CTT AAG ACC GCG ACC ACG GAG AAG GAC GTG GTG TGT GGA CCC	480	H4-IBBFL
141	Leu Asp Gly Arg Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro	160	
481	CCT CTC CTC ACC TTC TCT CCC ACT ACC ACC ATT TCT CTC ACT CCA GAG GGA GGA CCA GGA	540	
161	Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu Gly Gly Pro Gly	180	
541	GCG CAC TCC TTC CAG GTC CTT ACC TTC TTC CTC GCG CTC ACA TCG GCT TTC CTC CTC GCG	600	
181	Gly Ile Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala Leu Thr Ser Ala Leu Leu Ala	200	
601	CTG ATC TTC ATT ACT CTC CTC TTC TCT GTC CTC AAA TCG ATC AGC AAA AAA TTC CCC CAC	660	
201	Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His	220	
661	ATA TTC AAG CAA CCA TTT AAG AAG ACC ACT GGA GGA GCT CAA CAG CAA GAT GGT TGT AGC	720	
221	Ile Phe Lys Glu Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Glu Glu Glu Asp Ala Cys Ser	240	
721	TGC CCA TGT CCA CAG GAA GAA GAA GGA GGA GGA GGC TAT CAG CTC TGA TGTACTATC	780	
241	Cys Arg Cys Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu ---		
781	CTAGGAGATG TGTGGGCGGA AAGCGAGAAG CACTAGGACC CGACCATCCT GTGGACAGC ACAAGCAACC	850	
851	CCACCACCCT GTTCTTACAC ATCATCCTAG ATGATGTGTG GCGCGGCACC TCATCCAACT CTCTTCTAAC	920	
921	GCTAACATAT TGTCTTTAC CTTTTTTAAA TCTTTTTTAA AATTAAATTT TTATGTGTGT GAGTGTTTTG	990	
991	CCTGCTGTGA TGCACACGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGAC ACTCTCTATG CCTGAGGAGG TCAGAAAGAA	1060	
1061	AAGGGTTGGT TCCATAAGAA CTGGAGTTAT GGATGGCTGT GAGCGCGGnnn GATAGGTCCG GACGGAGACC	1130	
1131	TGTCTTCTTA TTTAAAGCTG ACTCTATGAT AAAAATAAAA TGATATTTTC GGAATTGTAG AGATTGTCTT	1200	
1201	GACACCCCTT TAGTTAATGA TCTAAGAGGA ATTGTTGATA CGTAGTATAC TGTATATGTC TATGTATATG	1270	
1271	TATATGTATA TATAAGACTC TTTTACTGTC AAAGTCAACC TAGAGTGCTT GGTACCAGG TCAATTTTAT	1340	
1341	TGGACATTTT ACCTCACACA CACACACACA CACACACACA CACGTTTATA CTAGCTACTGT TATCGGTAT	1410	
1411	TCTACCTCAT ATAATGGGAT AGGGTAAAG GAAACCAAGC AGTCAGTAT ATTATTCTGCA CCGACAGCA	1480	
1481	CTACCCCTTC TGGGTACGTA GGGACAGACC TCCTTCGGAC TGTCTAAAGC TCGGCTTAGA AGTCTCTCA	1550	
1551	AGTTCGCCGA CCAAGACGAC AGAGGAGACA CAGTCGCAAA AGTTATTTT CCGGCAAAATC GTTTCCTGT	1620	
1621	TCTGTGACAC TCCACCCCTT GTGACACTT GAGTGTCATC CTTCGCGCGG AAGGTCAGCT GGTACCCGTC	1690	
1691	TGTAGGCGCG GCGAGACAGA GCGCGCGCGG AGCTACGAGA ATCGACTCAC AGGCGCGCCC GCGCTTCGCA	1760	
1761	AATCAAACTT TTTAATGTC ACAAGTTTCG TCCGCGCTCG GCGGACCTAT GCGCTCGATC CTATTACCT	1830	
1831	TATCCTGGCG CCAAGATAAA ACAACCAAAA GCCTTGACTC CGGTACTAAT TCTCCCTGCC GCGCCCGTA	1900	
1901	AGCATAAAGC GCGCATCTCC ACTTTAAGAA CCGTGGCGCG TCTGCGCTGG TCTGCGTTTC GTAAACGGTT	1970	
1971	CTTACAAAGT TAATTAGTTC TGGCTTTTCA CTTCCAAAGT TGTCTAGTC TATGCGAGCA TCAAGCGCTG	2040	
2041	TATTTGCTAC GCGTGACCGG TACGCGCGCG CAATAAGGCT ACTCGCGCGG CCGTGGAAAG CCCTTTGGTT	2110	
2111	TCAGAAACCC AAGGCCCCCC TCATACCAAC GTTTCGACTT TGATTCTTGC CGGTACGTCG TGTGCGGTGC	2180	
2181	CTTAGCTCTT TCTCGTAGT TAG AC		

Fig 2a

homólogo humano de 4-1bb de ratón

h4-1bb Longitud: 838

```

1  AAACAGCTTT GCTAGTATCA TACCCTGTCC AGATTTCATC ATGGGAACA
51  GCTGTACAA CATAGTAGCC ACTCTGTTC TGGTCTCAA CTGTGAGAG
101  ACAAGATCAI TGCAGGATCC TTGTAGTAA TCCCGAGCTG GTACAATCTG
151  TGATAATAAC AGGAATCAGA TTTCAGTCC CTGCTCTCCA AATAGTTCI
201  CCAGCGCAGG TGGACAAAGG ACCCTGTACA TATGCAGGCA GGTAAAGGT
251  GTTTTCAGGA CCAGGAAGGA GTGTCTTCC ACCAGCAAIG CAGAGTGTG
301  CTGCATCTCA GGTTTTCAT GCTTGGGGGG AGGATGCAGC ATGTGTGAAC
351  AGGATGTAA ACAAGGTCAA GAATGACAA AAAAGCTTG TAAAGATGT
401  TGTCTTGGCA CATTAACGA TCAGAAAGGT GGCACTGTIC GACCTTGGAC
451  AAATGTTCI TTGATGGAA AGCTGTGCT TGTGAATGG ACGAAGGAGA
501  GGGACGTGT CTGTGGACCA TCTCAGCTG ACCCTCTTCC GGGAGCATCC
551  TCTGTACCC CGCTGCCCC TCGAGAGAG CCAGGACACT CTCTGCAGAT
601  CATCTCTTC TTCTTGGCC TGACGTGAC TCGTGTCTC TCTCTCTGT
651  TCTCTCTCAE GCTCTTTC TCTGTGTA AACGGGGTAC AAGAAATCT
701  CTGTATAT TCAACAAAC ATTATGAGA CCAGTACAA CTACTAAGA
751  GGAAGATGCC GTAGCTGCC GATTCCTAGA AGAAGAAGAA GGAGATGTG
801  AACCTGTAAA TGAAGTCAA TAGGCTGTI GGCACIT

```

Fig 2b

```

1  MGNSTNIVA TLLLVNFER TRSIODPCSH CFAGTCDHW RHOICSPCP
51  NSTSSAGGCR TCDICROCKG VIRIRKESS ISNAECCTP GFHCLGAGCS
101  MCEODCKOGO ELTKKCKDC CTGTINDOKR GICRPMVNC LDGKSVLVNG
151  TKRDVVCEP SPADLSPGAS SVPPAFARE PGHSPDITST FLALISTALL
201  TLLPFLTR SYVKNRKKL LYTKOPIMR PVOTIODEED CSCRPFEEE
251  GGCEL*

```

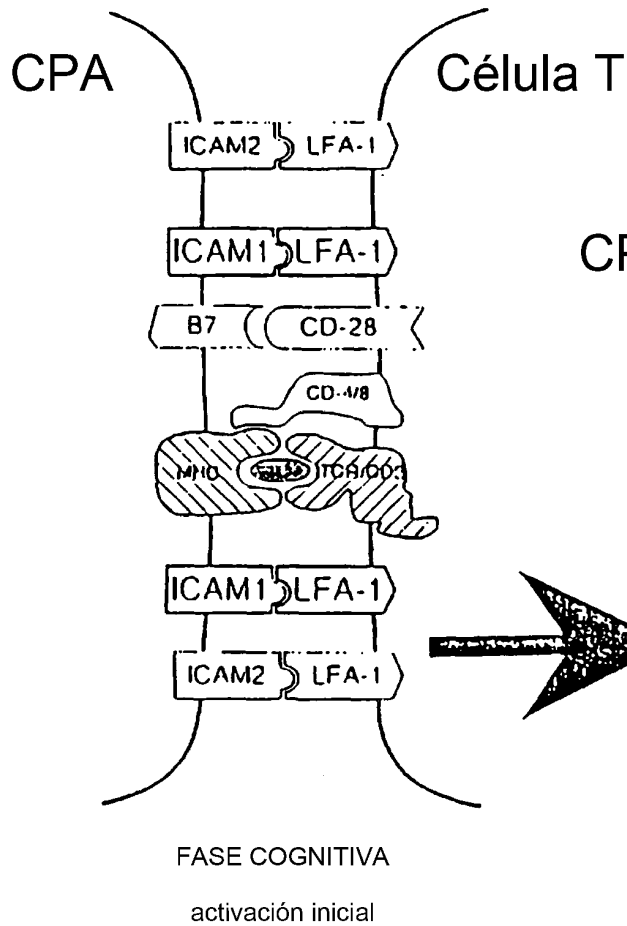


Fig. 3a

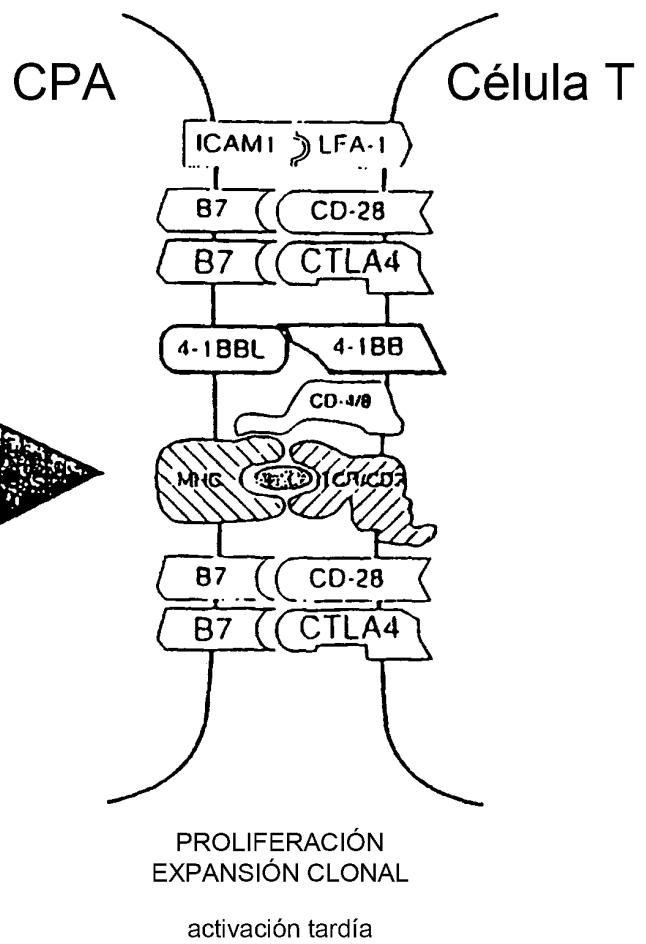


Fig. 3b

RED DE ACTIVACIÓN NORMAL DE UNA CÉLULA T

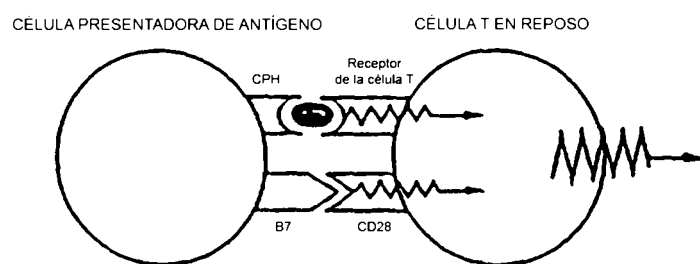


Fig. 4a

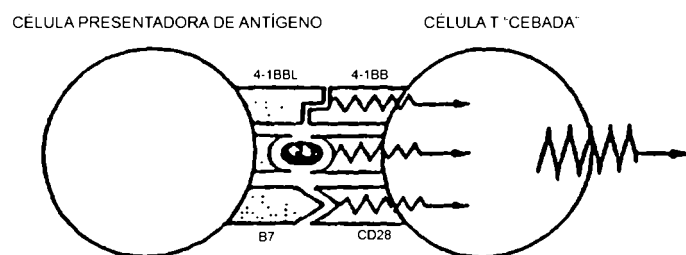


Fig 4b

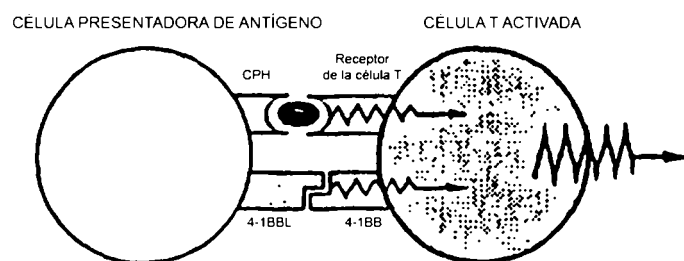


Fig. 4c

RED DE ACTIVACIÓN DE UNA CÉLULA T CON ETAPAS DE BLOQUEO

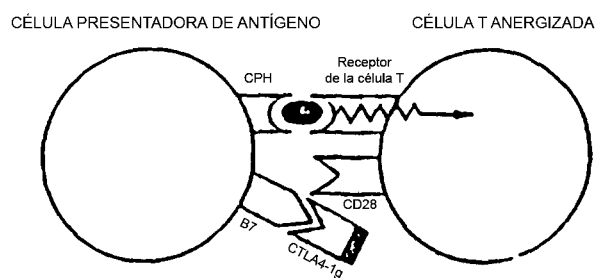


Fig 5a

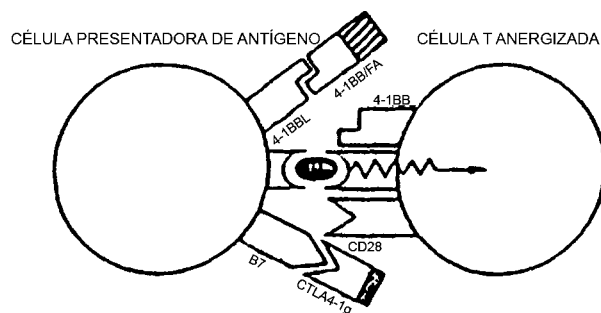


Fig. 5b

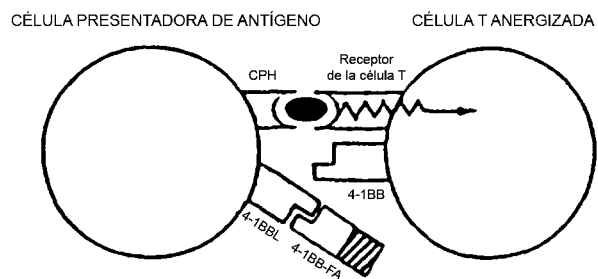


Fig 5c

ES 2 341 631 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Byoung Se Kwon
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: New Human Receptor and Related Products and Methods
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1
- 10 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Barnard & Brown
- (B) CALLE: 306 E. State St., Suite 220
- 15 (C) CIUDAD: Ithaca
- (D) ESTADO: Nueva York
- (E) PAÍS: Estados Unidos
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 14850
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete de 3,50 pulgadas, almacenamiento de 1,4 Mb
- (B) ORDENADOR: Compatible con IBM AT
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: MS DOS, versión 5.0
- (D) PROGRAMAS: Programa especial en QBasic
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/012.269
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 1/2/93
- 40 (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/922.996
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 30/7/92
- 45 (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/267.577
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7/11/88
- 50 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Michaels, Christopher A.
- (B) NÚMERO DE INSCRIPCIÓN: 34.390
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/SUMARIO: kwnh41bb
- 55 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 607-273-1711
- (B) TELEFAX: 607-273-2609
- 60 (C) TÉLEX:

(2) INFORMACIÓN PARA LA ID SEC Nº 1:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 838
- (B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 341 631 T3

(C) TIPO DE CADENA: doble cadena

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(iii) HIPOTÉTICA: No

(iv) ANTISENTIDO: No

(v) TIPO DE FRAGMENTO: n/d

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Humano

(B) CEPA:

(C) AISLADO INDIVIDUAL: H4-1BB N° 1

(D) ETAPA DE DESARROLLO: Célula T diferenciada

(E) HAPLOTIPO:

(F) TIPO DE TEJIDO:

(G) TIPO DE CÉLULA: Linfocitos

(H) LÍNEA CELULAR:

(I) ORGÁNULO:

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) GENOTECA: Genoteca de ADNc

(B) CLON:

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) CROMOSOMA/SEGMENTO:

(B) POSICIÓN EN EL MAPA:

(C) UNIDADES:

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: H4-1BB

(B) UBICACIÓN:

(C) PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: Similitud con 4-1BB de ratón y otros miembros de la superfamilia RFCN

(D) OTRA INFORMACIÓN:

(x) INFORMACIÓN DE PUBLICACIONES:

(A) AUTORES: Kwon, B.S., y Weissman, S.M.

(B) TÍTULO: cDNA sequences of two inducible T-cell genes

(C) REVISTA: Proc. Natl. Acad. Sci. USA

(D) TOMO: 86

(E) NÚMERO:

(F) PÁGINAS: 1963-1967

(G) RESIDUOS RELEVANTES: todos

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIAS: ID SEC N° 1:

ES 2 341 631 T3

	AATCAGCTTT			GCTAGTATCA			TACCTGTGCC			AGATTTCATC							40
5	ATG	GGA	AAC	AGC	TGT	TAC	AAC	ATA	GTA	GCC	ACT	CTG	TTG	CTG	GTC	85	
	Met	Gly	Asn	Ser	Cys	Tyr	Asn	Ile	Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Val		
	1				5					10					15		
	CTC	AAC	TTT	GAG	AGG	ACA	AGA	TCA	TTG	CAG	GAT	CCT	TGT	AGT	AAC	130	
	Leu	Asn	Phe	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn		
					20					25					30		
10	TGC	CCA	GCT	GGT	ACA	TTC	TGT	GAT	AAT	AAC	AGG	AAT	CAG	ATT	TGC	175	
	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys		
					35					40					45		
15	AGT	CCC	TGT	CCT	CCA	AAT	AGT	TTC	TCC	AGC	GCA	GGT	GGA	CAA	AGG	220	
	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg		
					50					55					60		
	ACC	TGT	GAC	ATA	TGC	AGG	CAG	TGT	AAA	GGT	GTT	TTC	AGG	ACC	AGG	265	
	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	Phe	Arg	Thr	Arg		
					65					70					75		
20	AAG	GAG	TGT	TCC	TCC	ACC	AGC	AAT	GCA	GAG	TGT	GAC	TGC	ACT	CCA	310	
	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp	Cys	Thr	Pro		
					80					85					90		
25	GGG	TTT	CAC	TGC	CTG	GGG	GCA	GGA	TGC	AGC	ATG	TGT	GAA	CAG	GAT	355	
	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	Gln	Asp		
					95					100					105		
	TGT	AAA	CAA	GGT	CAA	GAA	CTG	ACA	AAA	AAA	GGT	TGT	AAA	GAC	TGT	400	
	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	Cys		
					110					115					120		
30	TGC	TTT	GGG	ACA	TTT	AAC	GAT	CAG	AAA	CGT	GGC	ATC	TGT	CGA	CCC	445	
	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro		
					125					130					135		
35	TGG	ACA	AAC	TGT	TCT	TTG	GAT	GGA	AAG	TCT	GTG	CTT	GTG	AAT	GGG	490	
	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly		
					140					145					150		
	ACG	AAG	GAG	AGG	GAC	GTG	GTC	TGT	GGA	CCA	TCT	CCA	GCT	GAC	CTC	535	
	Thr	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu		
					155					160					165		
40	TCT	CCG	GGA	GCA	TCC	TCT	GTG	ACC	CCG	CCT	GCC	CCT	GCG	AGA	GAG	580	
	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu		
					170					175					180		
45	CCA	GGA	CAC	TCT	CCG	CAG	ATC	ATC	TCC	TTC	TTT	CTT	GCG	CTG	ACG	625	
	Pro	Gly	His	Ser	Pro	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Phe	Leu	Ala	Leu	Thr		
					185					190					195		
	TCG	ACT	GCG	TTG	CTC	TTC	CTG	CTG	TTC	TTC	CTC	ACG	CTC	CGT	TTC	670	
	Ser	Thr	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Phe	Leu	Thr	Leu	Arg	Phe		
					200					205					210		
50	TCT	GTT	GTT	AAA	CGG	GGC	AGA	AAG	AAA	CTC	CTG	TAT	ATA	TTC	AAA	715	
	Ser	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys		
					215					220					225		
55	CAA	CCA	TTT	ATG	AGA	CCA	GTA	CAA	ACT	ACT	CAA	GAG	GAA	GAT	GGC	760	
	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly		
					230					235					240		
	TGT	AGC	TGC	CGA	TTT	CCA	GAA	GAA	GAA	GAA	GGA	GGA	TGT	GAA	CTG	805	
	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu		
					245					250					255		
60	TGAAATGGAA			GTCAATAGGG			CTGTTGGGAC			TTT							838

65