



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 285 763**

⑤1 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **98905708 .8**

⑧6 Fecha de presentación : **27.02.1998**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0984023**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2000**

⑤4 Título: **Molécula de superficie celular que media la adhesión celular y la transmisión de señales.**

③0 Prioridad: **27.02.1997 JP 9-62290**
26.02.1998 JP 10-62217

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

⑦3 Titular/es: **Japan Tobacco Inc.**
2-1, Toranomon 2-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8422, JP

⑦2 Inventor/es: **Tamatani, Takuya y**
Tezuka, Katsunari

⑦4 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Molécula de superficie celular que media la adhesión celular y la transmisión de señales.

5 La presente invención se refiere a nuevas moléculas de superficie celular de seres humanos; a polipéptidos y los fragmentos de los mismos que constituyen las moléculas; a los genes que codifican los polipéptidos y los fragmentos; a vectores que comprenden los genes; a transformantes en los que se introducen los vectores; a anticuerpos que son reactivos frente a los polipéptidos o a las moléculas de superficie celular que comprenden los polipéptidos y fragmentos de los mismos; a composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos; y a los usos de los mismos y células que producen anticuerpos.

10 El cuerpo vivo de los mamíferos tiene sistemas de respuesta inmunitaria que excluyen microorganismos patógenos (virus, bacterias, parásitos, etc.) o cuerpos extraños (ambos se llaman "antígeno" en lo sucesivo) que han invadido el cuerpo vivo. Uno de ellos se llama sistema de respuesta inmunitaria natural, y el otro sistema de respuesta inmunitaria adquirida. El primero es un mecanismo de exclusión que comprende la fagocitosis por fagocitos (leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, etc.), el ataque por linfocitos agresores naturales (NK), y el reconocimiento no específico tal como la opsonización del antígeno por complementos. El segundo, el sistema de respuesta inmunitaria adquirida, es un mecanismo de exclusión por linfocitos (principalmente, células T y células B) que adquieren especificidad para el antígeno (es decir linfocitos activados). Las células B que adquieren especificidad para el antígeno, atacan el antígeno que existe fuera de las células por la producción de anticuerpos específicos para el antígeno. Las células T que adquieren especificidad para el antígeno (es decir, las células T activadas) se clasifican en células T auxiliares y células T citotóxicas (linfocitos citotóxicos, CTL). Las células T auxiliares regulan la diferenciación de las células B y la producción de anticuerpos, y destruyen el antígeno cooperando con los fagocitos. Estos últimos, CTL, atacan a las células infectadas por virus y demás por sí mismas (Experimental Medicine: SUPPLEMENT, "Bio Science Tenn Library, Immunity", Yodosha, pp.14-17 (1995)).

15 Esta adquisición de especificidad para el antígeno por las células T (es decir, activación de las células T) se inicia por el reconocimiento por las células T del antígeno presentado por las células presentadoras de antígeno (APC) tales como macrófagos, células B o células dendríticas. Las células presentadoras de antígeno procesan los antígenos incorporados y presentan estos antígenos procesados uniéndolos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células T reciben la señal primaria para la activación de las células (o adquisición de la especificidad) por el reconocimiento de los antígenos procesados presentados por las células presentadoras de antígeno por un complejo entre el receptor de células T (TcR) y el antígeno CD3 que existe en la superficie de la membrana celular (complejo TcR/CD3).

20 Sin embargo, la señal primaria mediada por el complejo TcR/CD3 sola no puede activar las células T suficientemente y conduce a la apatía y anergia clonal, de modo que las células no pueden reaccionar con ninguna estimulación recibida después. La señal autocrina de la interleucina 2 (IL-2) es necesaria para que se activen las células T, para que se diferencien en clones de células T específicas para el antígeno, y para la proliferación. En la anergia clonal las células T están inactivadas debido a que no hay producción de IL-2 y no hay división celular. Es decir, la activación de las células T acompañada de la producción de citocinas tales como la IL-2 requiere la señal secundaria que sigue a la señal primaria por el complejo TcR/CD3. Esta señal secundaria se llama señal coestimuladora.

25 Las células T reciben esta señal secundaria y la transmiten a las células interaccionando (adhesión celular) con moléculas distintas del MHC en las células presentadoras de antígeno a través de moléculas distintas del complejo TcR/CD3 en la superficie de la célula T. Esta señal secundaria evita la anergia celular (anergia clonal) y activa la célula.

30 Aunque parte del mecanismo de transmisión de la señal secundaria entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos tales como las células T, no se ha elucidado con detalle, los estudios hasta ahora han puesto de manifiesto que un factor importante para la señal secundaria es la interacción de CD28 (llamado también Tp44, T44 o antígeno 9.3), que es una molécula de superficie celular expresada principalmente en células T y células del timo, con CD80 (también llamado B7-1, B7, BB1 o B7/BB1), que es una molécula de superficie celular expresada en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, monocitos, células dendríticas, etc.) y con CD86 (llamado también B7-2 o B70), que también es una molécula de superficie celular en las células presentadoras de antígeno (es decir, adhesión celular por la unión entre estas moléculas). Además, experimentalmente se ha elucidado que la interacción del antígeno 4 asociado con linfocito T citolítico (CTLA-4), cuya expresión se cree que es potenciada dependiendo de la señal secundaria, con el CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) (es decir, adhesión celular por la unión entre estas moléculas) también tiene una función importante en la regulación de la activación de células T por la señal secundaria. En otras palabras, la regulación de la activación de las células T por la transmisión de la señal secundaria implica al menos la interacción entre CD28 y CD80/CD86, la potenciación de la expresión de CTLA-4, que se cree que depende de la interacción, y la interacción entre CTL-4 y CD80/CD86.

35 Se sabe que CD28 es una molécula coestimuladora que transmite la señal secundaria (señal coestimuladora) necesaria para la activación de las células T y para evitar la anergia. La señal secundaria transmitida por unión de esta molécula a las moléculas coestimuladoras, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), en las células presentadoras de antígeno (adhesión celular por la unión entre estas moléculas), estabiliza el ARNm de las citocinas de tipo Th1 y por consiguiente promueve la producción de células T de una gran cantidad de citocinas de tipo Th1 tales como IL-2, IFN γ y

TNF α . La expresión de CTLA-4 es inducida por la señal primaria transmitida a través de TcR/CD3, y la expresión también es potenciada por la señal secundaria transmitida por la unión entre CD28 y CD80. Se ha puesto de manifiesto que CTLA-4 recibe estas señales para trabajar para la inhibición de la función de las células T, que es contraria a la activación de las células T por la señal secundaria transmitida por CD28.

CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas de tipo I cuyos pesos moleculares son 44 kD y de 41 a 43 kD, respectivamente. Ambas tienen un dominio de tipo inmunoglobulina, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y tienen tanto función de molécula de adhesión celular como función de molécula transmisora de señales.

El CD28 humano forma un homodímero con un enlace disulfuro, mientras que CTLA-4 existe como monómero. Tanto los genes de CD28 como de CTLA-4 están situados en "2q33" en el cromosoma humano y "1C" en el cromosoma de ratón, y están compuestos de 4 exones. CD28 y CTLA-4 humanos están compuestos de 220 y 223 aminoácidos, respectivamente, incluidas las secuencias líder, y la homología de aminoácidos entre ellos es de 20 a 30%.

Los ligandos para CD28 y CTLA-4 son CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en el ser humano y ratones. CTLA-4 tiene aproximadamente una afinidad 20 veces más alta para ambos ligandos que CD28. Se ha elucidado que las estructuras de secuencias de aminoácidos "MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Tyr)" conservadas a través de las especies animales son importantes para la unión de CD28 y CTLA-4 a CD80 (B7-1). También se ha descrito que cuando se estimula CD28, la quinasa PI3 (fosfoinosítido-3-quinasa, PI3K) se asocia con el resto de tirosina fosforilada en una secuencia parcial "YMN (Tyr-Met-Asn-Met)" de CD28, y que CD28 tiene una función importante en la transmisión intracelular de señales por medio de esta estructura "YxxM". Además, se ha descrito que CTLA-4 también tiene una secuencia representada por "YxxM", es decir "YVKM (Tyr-Val-Lys-Met)" en su región citoplasmática, y que después de ser estimulado, SYP se asocia con esta secuencia.

CD28 se expresa específicamente en timocitos y células T de la sangre periférica, y CTLA-4 se expresa específicamente en células T activadas (Cell Engineering: SUPPLEMENT, "Handbook of Adhesion Molecule", Shujunsha, pp.93-102 (1994); *Ibid.* pp.120-136; Experimental Medicine: SUPPLEMENT, "BIO SCIENCE Term Library, Immunity", Yodosha, pp.94-98 (1995); Experimental Medicine: SUPPLEMENT, "BIO SCIENCE Term Library, Intracellular Signal Transduction", Yodosha, pp.58-59 (1997); Nihon Rinsho, Vol. 55, No.6, pp.215-220 (1997)).

Así, en la regulación de la función de las células T (la activación e inhibición de la función de las células T) se ha reconocido la importancia de las interacciones entre múltiples moléculas tales como moléculas coestimuladoras (CD28, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), etc.) y CTLA-4, que coopera con ella (en otras palabras, la adhesión celular por medio de la unión entre estas moléculas) y esto ha atraído la atención a la relación entre estas moléculas y enfermedades, y el tratamiento de enfermedades regulando la función de estas moléculas.

Como se ha descrito antes, aunque un cuerpo vivo activa su sistema de respuesta inmunitaria adquirida contra los antígenos que son cuerpos extraños para el (propio) cuerpo vivo, también tiene tolerancia inmunológica, de modo que no muestra respuesta inmunitaria contra sus propios componentes (autoantígeno). Si la tolerancia inmunológica se rompe por algún motivo, se produce la respuesta inmunitaria al autoantígeno, las células T reactivas frente a autoantígenos son inducidas por el mismo mecanismo mencionado antes para caer en un estado de inmunidad anómalo, y se producen diferentes enfermedades autoinmunes.

En otras palabras, puesto que las células presentadoras de antígeno (APC) no estimuladas en los tejidos normales no expresan moléculas coestimuladoras cuando el sistema inmunitario de un cuerpo vivo es normal, las células T están en el estado apático para mantener la tolerancia inmunológica, incluso si existen células T reactivas al autoantígeno, que reaccionan con autoantígenos. Se ha sugerido que en un estado de inmunidad anómalo son activadas más células T reactivas al autoantígeno debido al exceso anómalo y a la expresión continua de moléculas coestimuladoras produciendo así las enfermedades autoinmunes.

Partiendo de estos puntos de vista, recientemente se han hecho muchos intentos de tratar diferentes enfermedades autoinmunes modulando la transmisión de las señales coestimuladoras, por ejemplo, se propone la transmisión de señales mencionada entre CD28/CTLA-4 y CD80/CD86.

Se ha observado que CD80, una molécula coestimuladora como ligando de CD28 y CTLA-4, se expresa de forma anómala en las células presentadoras de antígeno en el nido de la enfermedad autoinmune tal como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, dermatitis de contacto de tipo alérgica, y dermatosis inflamatoria crónica tal como liquen plano y psoriasis. A partir de esta observación se han hecho muchos intentos para tratar diferentes enfermedades autoinmunes modulando la función de CD80.

Se ha propuesto bloquear la función de CD80 por procedimientos que usan un anticuerpo contra CD80, proteína solubilizada de CD28 que es un ligando de CD80, y proteína solubilizada de CTLA-4 que también es un ligando de CD80. En particular, basándose en el hecho de que la afinidad de unión de CTLA-4 a CD80 es 20 veces o más, mayor que la de CD28, se llevaron a cabo intentos terapéuticos que usaban "CTLA-4 solubilizado", específicamente, proteína de fusión (CTLA-4-IgFc) que comprendía el dominio extracelular de "CTLA-4" y la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1, en moldeos animales y ensayos clínicos (Nihon Rinsho, Vol. 55, No.6, pp.215-220 (1997)).

Como se muestra en los siguientes puntos 1 a 5, se han descrito los efectos terapéuticos de CTLA-4-IgFc en modelos animales de enfermedades autoinmunes.

1. En un ratón (NZB/NZW)F1, que es un modelo para el lupus eritematoso sistémico humano (LES), se suprimieron la producción de anticuerpos y el inicio de la nefritis por lupus por administración de CTLA-4-IgFc antes del inicio, y las afecciones patológicas se mejoraron por la administración del fármaco incluso antes del inicio (*Science*, Vol. 125, p.1225-1227 (1994)).

2. En la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), que es un modelo de la esclerosis múltiple (EM), se previno el inicio por la administración a corto plazo de CTLA-4-IgFc inmediatamente después de inmunización (*J. Clin. Invest.*, Vol. 95, pp. 2783-2789 (1995)).

3. En un ratón con DNO (diabetes no obesa), que es un modelo para la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), la tasa de inicio disminuyó notablemente por la administración de CTLA-4-IgFc al ratón hembra de 2 ó 3 semanas de edad durante dos semanas (*J. Exp. Med.*, Vol. 181, pp.1145-1155 (1995)).

4. En la nefritis de rata por inmunidad de la membrana basal del glomérulo renal, modelo de nefritis de Goodpasture, los síntomas mejoraron por la administración de CTLA-4-IgFc (*Eur. J. Immunol.*, Vol. 24, No.6, pp.1249-1254 (1994)).

5. En la artritis inducida por colágeno de tipo II (AIC) usando un ratón DBA/1, que es un modelo para la artritis reumatoide humana, se suprimió el inicio de la artritis por administración del fármaco de ensayo en el momento de inmunización y se inhibió la producción de autoanticuerpos (IgG1 y IgG2) contra el colágeno (*Eur. J. Immunol.*, Vol. 26, pp.2320-2328 (1996)).

Como se ha mencionado antes, los resultados de los experimentos todavía no han aclarado con detalle el mecanismo de la activación de células T por interacción entre moléculas coestimuladoras y las moléculas relacionadas (en otras palabras, la adhesión celular por la unión entre estas moléculas). Puede haber otras moléculas desconocidas implicadas en este mecanismo.

Descripción de la invención

Se pueden desarrollar productos farmacéuticos útiles para tratar o prevenir diferentes enfermedades tales como las enfermedades autoinmunes mencionadas, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias, si se aclara el mecanismo de activación de los linfocitos tales como las células T por adhesión celular por medio de la unión entre moléculas implicadas en la transmisión de la señal secundaria esencial para la activación de linfocitos tales como las células T mencionadas antes, y los mecanismos de la regulación de la función de linfocitos, y se identifican y caracterizan moléculas conocidas y desconocidas capaces de mediar la adhesión celular implicadas en el mecanismo y en la transmisión de señales.

Un objetivo de la presente invención es identificar nuevas moléculas de superficie celular que tengan funciones tanto de mediación de dicha adhesión celular como de transmisión de señales, y aclarar sus características estructurales y biológicas. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar productos farmacéuticos útiles para tratar o prevenir diferentes enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias usando las nuevas moléculas o anticuerpos contra las moléculas.

Con el fin de identificar dichas moléculas útiles, los autores de la presente invención se han centrado en el hecho de que los linfocitos tales como las células T tienen una función importante en las enfermedades autoinmunes y enfermedades alérgicas, y en el hecho de que la adhesión celular es esencial para la transmisión de señales de la señal secundaria (señal coestimuladora) de las células presentadoras de antígeno a los linfocitos, y se planea aislar e identificar moléculas de superficie celular que son expresadas específicamente en células linfocíticas y que median la adhesión celular.

Los autores de la presente invención obtuvieron anticuerpos monoclonales contra diferentes moléculas de superficie celular expresadas en la superficie de células linfocíticas, inmunizando animales contra las células linfocíticas, y aislaron e identificaron las moléculas de superficie celular deseadas que median la adhesión celular usando los anticuerpos monoclonales así obtenidos. Los procedimientos usados se describen con detalle a continuación.

Los autores de la presente invención primero administraron la línea de células linfocíticas de rata como antígeno a ratones, y prepararon diferentes anticuerpos monoclonales. Después, los anticuerpos monoclonales obtenidos se hicieron reaccionar con las células linfocíticas de rata usadas como antígeno, y se ensayó el efecto de los anticuerpos monoclonales dados a las células. Como resultado, se encontró que uno de los anticuerpos monoclonales aglutinaba fuertemente las células linfocíticas de rata (este anticuerpo monoclonal se llamó "anticuerpo JTT-1"). Además, se encontró que otro de los anticuerpos monoclonales inhibía fuertemente la aglutinación de las células linfocíticas de rata inducida por el "anticuerpo JTT-1" (este anticuerpo monoclonal se denominó "anticuerpo JTT.2").

Puesto que la aglutinación de células linfocíticas de rata por el "anticuerpo JTT-1" no era inhibida por los anticuerpos contra la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) o el antígeno asociado a la función de linfocito 1 (LFA-

1), que son las moléculas de adhesión celular conocidas más representativas expresadas en las células, los autores de la presente invención pensaron que esta aglutinación era causada por la adhesión celular por medio de moléculas de adhesión desconocidas que medían la adhesión celular.

- 5 Después, las moléculas de superficie celular (denominadas “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT.2”) reconocidas por cada uno de estos dos anticuerpos monoclonales, se identificaron, aislaron y caracterizaron.

Primero, se analizaron los patrones de expresión del “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT.2” en diferentes células por citometría de flujo basada en la técnica de anticuerpos fluorescentes usando el “anticuerpo JTT-1” y el “anticuerpo JTT-2”. Aunque tanto el “antígeno JTT-1” como el “antígeno JTT.2” eran muy expresados en células linfoblastos activadas (células linfoblastos T activadas, células linfoblastos B activadas, etc.) activadas por timocitos estimuladores y células del bazo con concanavalina A (ConA), un mitógeno, en particular en las células linfoblastos activadas, apenas se encontraba expresión en células del bazo no estimuladas en absoluto (estas células a veces se llaman “linfocitos en reposo” en este documento). Los patrones de expresión de las moléculas reconocidas por cada uno de los “anticuerpos JTT-1” y “anticuerpos JTT-2” eran casi los mismos.

Usando una columna de afinidad preparada uniendo el “anticuerpo JTT-1” a adsorbentes, las moléculas atrapadas por el “anticuerpo JTT-1”, es decir los “antígenos JTT-1”, se purificaron de la mezcla de las moléculas de superficie celular solubles preparadas a partir de las células linfocíticas de rata descritas antes. Los pesos moleculares de estos “antígenos JTT-1” purificados se analizaron por inmunoprecipitación usando el “anticuerpo JTT-1” y “anticuerpo JTT-2” y por SDS-PAGE. Como resultado, se encontró que las moléculas inmunoprecipitadas por cada uno de los “anticuerpos JTT-1” y “anticuerpos JTT-2” eran las mismas, y que cada molécula era un homodímero que tenía diferentes cadenas de azúcar. Específicamente, cuando las cadenas de azúcar unidas a N no eran digeridas, las moléculas se identificaron como una molécula con aproximadamente 47 kD en condiciones no reductoras, y como dos moléculas con aproximadamente 24 kD y aproximadamente 28 kD en condiciones reductoras; cuando las cadenas de azúcar unidas a N eran digeridas, las moléculas se identificaron como una molécula con aproximadamente 36 kD en condiciones no reductoras y como una molécula con aproximadamente 20 kD en condiciones reductoras.

Después se analizó la adhesión de los timocitos de rata a la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” purificado. Como resultado, los timocitos se adhirieron significativamente a la placa (es decir, al “antígeno JTT-1”) sólo en presencia del “anticuerpo JTT-1” y la adhesión era inhibida significativamente en copresencia del “anticuerpo JTT-2”, indicando que el “antígeno JTT-1” era la molécula de superficie celular que mediaba la adhesión celular.

Después, los autores de la presente invención clonaron genes que codificaban el “antígeno JTT-1” de rata, humano y de ratón, y analizaron sus estructuras.

Primero se aisló el ADNc que codificaba la longitud entera del “antígeno JTT-1 de rata” de la biblioteca de ADNc hecha a partir de linfoblastos derivados de bazo de rata estimulado con ConA por el procedimiento de clonación de la expresión usando el procedimiento de cribado que usa el “anticuerpo JTT-1”, y se aisló un gen de rata completamente nuevo y se identificó determinando su secuencia de nucleótidos por el procedimiento de didesoxi. También se aisló el ADNc que codificaba la longitud entera del “antígeno JTT-1 humano” de la biblioteca de ADNc hecha a partir de linfoblastos de sangre periférica humana estimulada con ConA por hibridación en placa usando como una sonda el ADNc que codifica el “antígeno JTT-1 de rata” obtenido, y se aisló un gen humano completamente nuevo y se identificó determinando su secuencia de nucleótidos por el procedimiento de didesoxi. De la misma forma, se aisló el ADNc que codificaba la longitud entera del “antígeno JTT-1 de ratón” de la biblioteca de ADNc hecha a partir de linfoblastos derivados de bazo de ratón estimulado con ConA, y se aisló un gen de ratón completamente nuevo y se identificó determinando su secuencia de nucleótidos por el procedimiento de didesoxi. Además, se aisló de la misma forma el ADNc que codificaba la longitud entera de la variante de religación alternativa del “antígeno JTT-1 de rata” mencionada antes, de la biblioteca de ADNc hecha a partir de la línea celular de timoma de rata y se aisló e identificó otro gen de rata completamente nuevo determinando su secuencia de nucleótidos por el procedimiento de didesoxi.

Se ha descubierto que el “antígeno JTT-1” era una proteína transmembrana (molécula de superficie celular) compuesta de una secuencia señal, una región extracelular que tiene el(los) sitio(s) de glicosilación, una región transmembrana y una región intracelular, por análisis gráfico de hidropatía de la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc aislado del “antígeno JTT-1 humano”. La búsqueda de homología con moléculas conocidas puso de manifiesto que los “antígenos JTT-1” de rata, humanos y de ratón no tenían una homología significativa con ninguna molécula conocida incluidas las moléculas de adhesión celular, lo que indica que son moléculas de superficie celular nuevas que median la adhesión celular.

Como resultado de la búsqueda de motivos basada en la secuencia de aminoácidos del “antígeno JTT-1 humano”, se encontró que el “antígeno JTT-1 humano” tenía similitud estructural con “CD28” mencionado antes, una molécula de superficie celular en linfocitos tales como células T, que transmite la señal coestimuladora importante para la activación de las células T por medio de la adhesión celular, y con “CTLA-4”, una molécula de superficie celular en linfocitos tales como células T, que regula las funciones de los linfocitos activados tales como las células T activadas, cooperando con la señal.

La similitud estructural es la siguiente.

ES 2 285 763 T3

1. 20 o más restos aminoácidos incluidos los restos cisteína están altamente conservados.

2. La secuencia de prolina que se repite "Por-Pro-Pro (PPP)" esencial como región de unión del ligando, está conservada en la región extracelular.

3. Una secuencia "Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM)" (Xaa y x representan cualquier aminoácido), secuencia esencial como región de transmisión de señal, está conservada en la región citoplasmática.

Se encontró que el locus del gen que codifica el "antígeno JTT-1 de ratón" en el cromosoma de ratón era "1C3", que es la misma posición que la de "CD28" y "CTLA-4" de ratón usando el procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Después, se examinó la eficacia de la terapia de enfermedades autoinmunes y enfermedades alérgicas regulando la función del "antígeno JTT-1", mediante experimentos en los que el "anticuerpo JTT-2" mencionado antes se administraba a ratas modelo para encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y nefritis de membrana basal glomerular (GBM). Se encontró que se suprimían significativamente las afecciones patológicas en ambos animales modelo de enfermedades, y que las enfermedades autoinmunes o enfermedades alérgicas se podían tratar regulando las funciones del "antígeno JTT-1".

También se encontró que el anticuerpo monoclonal contra el "antígeno JTT-1 humano" producía la proliferación significativa de linfocitos de la sangre periférica humana, y que la proliferación estaba más potenciada en presencia conjunta de un anticuerpo monoclonal contra CD3 que constituía un complejo TcR/CD3 en las células T, el cual recibe la señal primaria esencial para la activación de células T de las células presentadoras de antígeno, indicando que el "antígeno JTT-1" era una molécula de superficie celular implicada en la transmisión de señales a linfocitos.

Además, los autores de la presente invención consiguieron producir un polipéptido de fusión que comprendía una región extracelular del "antígeno JTT-1 humano" y la región Fc de la inmunoglobulina humana. El polipéptido de fusión es útil como producto farmacéutico para tratar enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias regulando las funciones del "antígeno JTT-1" y/o su ligando.

Además, los autores de la presente invención consiguieron preparar un ratón transgénico en el que se había introducido un gen que codificaba el "antígeno JTT-1" de otra especie animal. El ratón transgénico es útil para analizar las funciones detalladas del "antígeno JTT-1" y para desarrollar productos farmacéuticos para tratar enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas y enfermedades inflamatorias. Los autores de la invención también produjeron un ratón silenciado en el que se había inactivado el gen endógeno que codifica el "antígeno JTT-1 de ratón". Este ratón silenciado también es útil para el propósito mencionado.

La presente invención se refiere a:

(1) una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(b) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;

(c) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de 26 a 625 de SEQ ID NO: 3;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de 1 a 140 de SEQ ID NO: 2.

Además se refiere a (2) la molécula de ácido nucleico de (1), que es un ADNc.

(3) Un gen que comprende el ácido nucleico (1) o (2).

(4) Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de (1) o (2) o el gen de la reivindicación 3.

(5) Una célula recombinante en la que se ha introducido el vector de (4).

(6) La célula recombinante de (5) que está identificada por el n° de acceso al depósito internacional FERM BP-5725.

(7) Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

(8) Un anticuerpo específico para el polipéptido (7), en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo seleccionado del grupo constituido por anticuerpo de rata, anticuerpo de cobaya, anticuerpo de conejo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo humano.

ES 2 285 763 T3

(9) El anticuerpo de (8), en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una parte del anticuerpo monoclonal, en el que la parte se selecciona del grupo constituido por F(ab')₂, Fab' y Fab.

5 (10) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de (8) o (9) o una parte del anticuerpo monoclonal definido en (9), y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

(11) Uso del anticuerpo de (8) o (9) o una parte del anticuerpo monoclonal definido en (9) para preparar una composición farmacéutica para tratar enfermedades inflamatorias, o para prevenir dicho síntoma de enfermedad y

10 (12) una célula que produce anticuerpos, que produce el anticuerpo monoclonal de (9).

La presente solicitud describe polipéptidos, genes, anticuerpos, vectores, transformantes, composiciones farmacéuticas, ratones transgénicos, ratones silenciados y demás, que son importantes para un "antígeno JTT-1" de mamífero nuevo aislado e identificado como se ha mencionado antes. Específicamente, a continuación se describen en el presente documento (1) a (36).

(1) Un polipéptido que constituye una molécula de superficie celular que tiene las siguientes características,

20 (a) dicha molécula de superficie celular se expresa en al menos timocitos y células linfoblastos estimulados por mitógenos,

(b) un anticuerpo reactivo frente a dicha molécula de superficie celular induce adhesión entre las células linfoblastos estimulados por mitógeno,

25 (c) un anticuerpo reactivo frente a dicha molécula de superficie celular induce la proliferación de linfocitos de sangre periférica en presencia de un anticuerpo contra CD3,

(d) dicha molécula de superficie celular tiene una secuencia de aminoácidos parcial representada por Phe-Asp-Pro-Pro-Phe en su región extracelular, y

30 (e) dicha molécula de superficie celular tiene una secuencia de aminoácidos parcial representada por Tyr-Met-Phe-Met en su región citoplasmática.

35 (2) El polipéptido de (1) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en la que se han sustituido, suprimido o añadido uno o más aminoácidos.

(3) El polipéptido de (1), que es codificado por una ADN que hibrida con un ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas.

40 (4) El polipéptido de (1) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 60% o más de homología con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

(5) El polipéptido de cualquiera de (1) a (4) en el que dicha molécula de superficie celular se obtiene de ser humano.

45 (6) Un gen que codifica el polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5).

(7) El gen de (6) en el que dicho gen es un ADNc.

50 (8) El gen de (7) en el que dicho ADNc tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

(9) El gen de (7) en el que dicho ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 26 a 625 de SEQ ID NO: 3, restos nucleótidos 35 a 637 de SEQ ID NO: 4, restos nucleótidos 1 a 603 de SEQ ID NO: 5, o restos nucleótidos 35 a 685 de SEQ ID NO: 6.

55 (10) Un vector que comprende el gen de uno cualquiera de (6) a (9).

(11) Un transformante en el que se ha introducido el vector de (10).

60 (12) Un transformante identificado por un n° de acceso al depósito internacional FERM BP-5725.

(13) Un fragmento de polipéptido que comprende una región extracelular del polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5).

65 (14) El fragmento de polipéptido de (13) en el que dicho polipéptido es un polipéptido derivado de ser humano, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

(15) Un gen que codifica el fragmento de polipéptido de (13) o (14).

ES 2 285 763 T3

- (16) Una molécula homodímera que comprende dos fragmentos de polipéptido, en la que cada uno de los fragmentos comprende una región extracelular del polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5) y dichos dos fragmentos de polipéptido están unidos entre sí por enlaces disulfuro.
- 5 (17) La molécula homodímera de (16) en la que dicho polipéptido es un polipéptido derivado de ser humano, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- (18) Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de polipéptido de (14) o la molécula homodímera de (17), o ambos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 (19) Un polipéptido de fusión que comprende una región extracelular del polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5) y una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana (Ig) o una parte de la región constante.
- 15 (20) El polipéptido de fusión de (19) en el que la inmunoglobulina es IgG.
- (21) El polipéptido de fusión de (19) en el que la parte de la región constante comprende una región de bisagra, dominio C2 y dominio C3 de la IgG.
- 20 (22) El polipéptido de fusión de uno cualquiera de (19) a (21) en el que dicho polipéptido es un polipéptido derivado de ser humano que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- (23) Una molécula homodímera que comprende dos polipéptidos de fusión de uno cualquiera de (19) a (22) en la que los dos polipéptidos están unidos entre sí por enlaces disulfuro.
- 25 (24) Una molécula homodímera que comprende dos polipéptidos de fusión de (22) en la que los dos polipéptidos están unidos entre sí por enlaces disulfuro.
- (25) Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión de (22) o la molécula homodímera de (24), o ambos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 (26) La composición farmacéutica de (25) en la que dicha composición farmacéutica se usa para tratar enfermedades autoinmunes o enfermedades alérgicas, o para prevenir dichos síntomas de enfermedad.
- 35 (27) Un anticuerpo o una parte del mismo reactivo frente al polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5), el fragmento de polipéptido de (13) o (14), o la molécula de superficie celular que comprende dicho polipéptido.
- (28) El anticuerpo de (27) o una parte del mismo, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 40 (29) Un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo, reactivo frente al polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, el fragmento de polipéptido de (14), o la molécula de superficie celular derivada de ser humano que comprende dicho polipéptido.
- (30) Un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo reactivo frente al polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5) o la molécula de superficie celular que comprende dicho polipéptido, en el que el efecto de dicho anticuerpo monoclonal en células de linfoblasto estimuladas por mitógeno es sustancialmente el mismo que el efecto de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma identificado por un nº de acceso al depósito internacional FERM BP-5707 en células linfoblastos de rata estimuladas por mitógeno.
- 45 (31) Un anticuerpo monoclonal o una parte del mismo reactivo frente al polipéptido de uno cualquiera de (1) a (5) o la molécula de superficie celular que comprende dicho polipéptido, en el que el efecto de dicho anticuerpo monoclonal en células de linfoblasto estimuladas por mitógeno es sustancialmente el mismo que el efecto de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma identificado por un nº de acceso al depósito internacional FERM BP-5708 en células linfoblastos de rata estimuladas por mitógeno.
- 50 (32) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de (29) o una parte del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 (33) La composición farmacéutica de (32) en la que dicha composición farmacéutica se usa para tratar enfermedades autoinmunes o enfermedades alérgicas, o para prevenir los síntomas de dicha enfermedad.
- 60 (34) Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de uno cualquiera de (28) a (31).
- (35) Un ratón transgénico en el que se integra en su gen endógeno un gen que codifica el polipéptido de (1) que es un gen derivado de ser humano que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1m o un gen derivado de rata que comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 35 a 637 de SEQ ID NO: 4.
- 65

(36) Un ratón silenciado en el que se inactiva su gen endógeno que codifica el polipéptido de ratón de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de SEQ ID NO: 5, de modo que dicho polipéptido de ratón no se produce.

Como se ha descrito antes, la molécula de superficie celular de la presente invención ("antígeno JTT-1") está implicada en la adhesión celular, transmisión de señales a linfocitos tales como células T y regulación de la función de linfocitos activados. A continuación se describe el conocimiento general de las células linfocíticas, moléculas de adhesión celular y la relación entre ellas y las enfermedades, para la comprensión general de estos sucesos biológicos, pero el conocimiento general no es para la limitación de la interpretación de la presente invención.

Los linfocitos se clasifican en líneas generales en dos clases, las células T y las células B. Después de la diferenciación de las células madre multipotentes en la médula ósea a células madre linfoides, algunas de ellas fluyen a la sangre para llegar al timo. Los linfocitos diferenciados y madurados en el timo, que se llaman células T (células T derivadas del timo), llegan a la sangre otra vez y circulan por todo el cuerpo. Las células T maduras tienen una molécula llamada CD3 en su superficie. La existencia de la molécula CD3 es un marcador para determinar si las células son células T maduras o no. CD3 es un marcador de células T convincente. Además, las células T expresan CD4 o CD8. Las células T se clasifican en células T auxiliares (células Th) que ayudan a la producción de anticuerpos por los linfocitos B, células T citotóxicas (células Tc, CTL) o linfocitos T citolíticos que se unen a las células objetivo para destruirlas directamente, células T supresoras que suprimen la producción de anticuerpos por los linfocitos B, y células T efectoras que segregan sustancias efectoras tales como linfocinas para producir alergia retardada.

Las células B derivan de las células madre linfoides diferenciadas y maduras en la médula ósea. Las células B son células precursoras que producen anticuerpos, puesto que producen anticuerpos con un estímulo adecuado. Las células B tienen inmunoglobulinas en su superficie celular, que son producidas en la célula. Dichas inmunoglobulinas funcionan como receptores para antígenos. Las células B maduras tienen tanto IgM como IgD en su superficie. Si las células B son diferenciadas con estimulación de antígeno y señales de las células T, aumenta la producción de IgM y cambian sus regiones C-terminales de unión a la membrana celular para ser secretadas. Con suficiente estimulación, no sólo cambian las inmunoglobulinas de la superficie a IgG, IgE e IgA, si no que además son secretadas las inmunoglobulinas de cada clase. La inmunoglobulina en la superficie de las células B a veces se representa como sIg, abreviatura de Ig de superficie, o mIg, abreviatura de Ig de membrana. Todas las Igs en la superficie de la misma célula B tienen los mismos sitios de unión del antígeno.

Hay linfocitos llamados linfocitos granulares grandes (LGL) o células nulas, que no son ni células T ni células B. Estas células pueden destruir células tumorales y células infectadas por virus sin estimulación previa con antígeno, que se puede comparar con el caso de las células T citotóxicas. Por lo tanto, también se llaman linfocitos agresores naturales (células NH).

Entre las células T mencionadas antes, las células T CD4 positivas segregan diferentes citocinas, receptores recién expresados para estas citocinas, aumentan su propio tamaño, empiezan la división celular, y proliferan, cuando reaccionan con antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno. Antes de estas reacciones a nivel celular, el complejo de los péptidos antígenos en las células presentadoras de antígeno y moléculas MHC de clase II se une al correspondiente receptor de antígeno de células T (TCR). Esto produce varios cambios bioquímicos en las células, y la señal es transmitida a los núcleos para empezar la transcripción de los ADN específicos y producir las proteínas respectivas. Como resultado, aumentan las reacciones al nivel celular. Por ejemplo, las células infectadas con un virus producen proteínas de virus y son degradadas a péptidos por proteosomas en el citoplasma. Una parte de los péptidos entran en el retículo endoplásmico a través de TAP, forman un complejo estable con las moléculas MHC de clase I recién producidas, y se transfieren a la superficie de la célula. El péptido transferido a la superficie celular es reconocido específicamente por las células T CD8 positivas, pero en esta etapa las células T todavía no pueden destruir las células infectadas. Estas células T que han reaccionado con el antígeno expresan el receptor de IL-2 (IL-2R), se diferencian en CTL de citotoxicidad celular por acción de la IL-2, y destruyen sus células objetivo para matarlas la siguiente vez cuando encuentren el mismo complejo de péptido antígeno/MHC de clase I. Las citocinas necesarias para la diferenciación en CTL no son sólo IL-2 si no también IFN γ y otras citocinas, que se cree que tienen acciones similares. Así, las linfocinas secretadas por las células T son necesarias para la diferenciación en CTL. Las linfocinas son producidas como resultado de que las células Th1 CD4 positivas (células T CD4 positivas que segregan IL-2 o IFN γ) reconocen los péptidos antígenos derivados del mismo virus con moléculas de clase II. En algunos casos, sin ayuda de las células T CD4 positivas, las células T CD8 positivas reaccionan con antígenos y producen IL-2 y otras citocinas. Cuando las células T CD8 positivas se diferencian en CTL, aumentan los gránulos en el citoplasma. Estos gránulos comprenden diferentes proteínas de alto peso molecular representadas por la perforina. La perforina parece un complejo de ataque a membrana (MAC) compuesto de cinco a nueve componentes de complemento, y hace agujeros en la membrana celular de las células objetivo. Además, los gránulos comprenden serina proteasas, LT, proteoglicano, etc. Además, si las células CD8 positivas diferenciadas en CTL reciben estimulación de antígeno, también segregan linfocinas tales como IFN γ , LT, TNF o IL-2. Además, las células T muestran el fenómeno de transformación en blasto, cuando reaccionan con hemaglutinina (fitohematoglutina, PHA) o ConA.

Las células T maduras no estimuladas en absoluto se llaman células T en reposo, y tienen un tamaño celular menor y tiempo de vida más corto, unos días. Cuando reciben estimulación, las células se agrandan como ya se ha mencionado, y son aptas para reaccionar con diferentes tipos de estimulación. Dichas células T se llaman células T activadas. Una parte de las células T activadas se convierten en células T con memoria, que llevan a reacción inmunitaria secun-

daria si reciben la misma estimulación de antígeno. Se cree que las células T con memoria se mantienen en circulación alrededor del cuerpo durante unos años o décadas.

Las células B no estimuladas en absoluto se llaman células en reposo como en el caso de las células T, y las células B que proliferan estimuladas con antígenos multivalentes o CD40L, se llaman células B activadas. Puesto que las células B en reposo no tienen moléculas coestimuladoras, que estimulen las células T con señales por el TCR, tal como B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86), se cree que la presentación de antígenos a las células T en reposo sólo estimula el TCR y no puede expresar ligandos CD40 (CD40L) o producir linfocinas. Por lo tanto, se cree que las células T auxiliares estimuladas con antígeno presentado por otras células presentadoras de antígeno reaccionan con el antígeno presentado por las células B en reposo. Es decir, si hay invasión de un antígeno, primero células dendríticas (células que tienen proyecciones dendríticas en el extremo) que expresan moléculas B7 o macrófagos activados reaccionando con microorganismos, presentan el antígeno y estimulan células T auxiliares en reposo para activarlas, para así expresar CD40L. Las células T auxiliares activadas entonces se unen a las células B en reposo que presentan el mismo antígeno y estimulan su CD40. Una vez que las células B son activadas por estimulación con antígenos multivalentes o CD40L, también expresan moléculas B7, activan células T auxiliares estimulando CD28 en su superficie con TCR, y permiten que las células T auxiliares expresen CD40L o produzcan linfocinas. Las células B que muestran cambios tales como la expansión del tamaño celular con la estimulación pero no muestran secreción de anticuerpos se llaman células B activadas. Si las células B maduras encuentran antígenos, la producción de IgM aumenta junto con la estimulación de células T y las moléculas de IgM así producidas son secretadas convirtiéndose de tipo membrana a tipo segregador. Además, producen anticuerpos isotípicos distintos de IgM, tal como IgG bajo los factores humorales de las células T. Esto se llama cambio de isotipo o cambio de clase. Las células B que segregan anticuerpos se llaman células secretoras de anticuerpos. Una parte de ellas se convierten en células morfológicamente características y se llaman una célula de plasma (*Knowledge of Immunology*, Ohmsha, (1996)).

A propósito de esto, en diferentes reacciones del sistema inmunitario, las subpoblaciones de leucocitos, es decir linfocitos T, linfocitos B, NK, neutrófilos, etc. a menudo muestran diferentes dinámicas entre sí. Incluso los mismos linfocitos como se ha mencionado antes, muestran diferentes dinámicas entre sí, dependiendo de si las células están activadas o en reposo. Estos factores implican la existencia de mecanismo de reconocimiento específico para la subpoblación de leucocitos de la sangre, y además, mecanismo de reconocimiento específico para el estado de las células, y en particular, moléculas de adhesión celular (proteínas de adhesión celular).

Las moléculas de adhesión celular o proteínas de adhesión celular, en general, son las moléculas que se adhieren células entre sí en el desarrollo y diferenciación de individuos o en la migración de células al sitio local, y se sabe que son moléculas esenciales para los contactos orgánicos y funcionales en un cuerpo vivo.

Las moléculas de adhesión celular en términos generales se clasifican por sus características estructurales en cinco (5) familias, superfamilia de inmunoglobulinas, familia de integrinas, familia de selectinas, familia de caderinas y familia CD44. Las moléculas de adhesión que pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas se caracterizan por la existencia de dominio de tipo bucle repetidos formados por enlaces disulfuro. Son ejemplos de las mismas la molécula de adhesión intercelular 1 "ICAM-1" y la molécula de adhesión celular vascular 1 "VCAM-1". Además, las moléculas de adhesión que pertenecen a la familia de las integrinas se caracterizan por la estructura de heterodímero α/β . Son ejemplos de las mismas, el antígeno muy tardío 1 a 6 "VLA 1 a 6", antígeno 1 asociado a la función de linfocitos "LFA-1", "Mac-1" y "p150/90". Las moléculas que pertenecen a la familia de las selectinas tienen el dominio de tipo lectina, dominio de tipo EGF, y dominio de complemento en este orden desde el extremo N. Son ejemplos de las mismas la "selectina E" y la "selectina P". Son ejemplos de la familia de la caderina la "caderina E", "caderina N" y "caderina P", y un ejemplo de la familia CD44 es "CD44".

Se sabe que la función específica de estas moléculas de adhesión es la adhesión de leucocitos de la sangre a células endoteliales vasculares o de linfocitos a células presentadoras de antígeno. A partir de varios estudios recientes, se ha puesto de manifiesto gradualmente que las moléculas de adhesión están implicadas no sólo en estas funciones si no también en diferentes enfermedades.

En particular, hay muchas publicaciones sobre enfermedades y anomalía de la expresión de moléculas de adhesión. Por ejemplo, para la artritis reumatoide (AR), se ha descrito que la expresión tanto de "Mac-1" como "p150/95" se fortalecía en sinoviocitos de la AR (Allen, C. y col., *Arthritis Rheum.*, Vol. 32, p. 947 (1989)). También se ha publicado que diferentes células expresaban "ICAM-1" de forma fuerte y ectópica en la membrana sinovial en la AR (Hale, L. y col., *Arthritis Rheum.*, Vol. 32, 15 p.22 (1989)). Otra publicación daba a entender que "ELAM-1" también estaba implicada en la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales vasculares y que la sobreexpresión de estas moléculas estaba implicada en la infiltración de neutrófilos (en especial, en el líquido sinovial), que se observa en el líquido sinovial en la AR (Laffon, A. y col., *Arthritis Rheum.*, Vol. 32, p.386 (1989)). Se ha publicado la expresión fuerte de "CD44" en células endoteliales vasculares y en sinoviocitos de tipo A en la membrana sinovial en la AR (Heynes, B. y col., *Arthritis Rheum.*, Vol. 34, p. 1434 (1991)).

Hay publicaciones de la relación entre el lupus eritematoso sistémico (LES) y la anomalía en la expresión de las moléculas de adhesión. Por ejemplo, se publicó que la capacidad de adhesión de los linfocitos T a células endoteliales vasculares cultivadas disminuía en pacientes de LES, comparado con voluntarios sanos. En linfocitos periféricos de pacientes con LES, las moléculas de adhesión "ICAM-1", "VLA-4", y "IFN-1" eran muy expresadas (Haskard, D. O. y col., *Rheumatol. Int.*, Vol. 9, p.33 (1989)).

Se ha descrito que en las enfermedades tiroideas autoinmunes se expresaba "ICAM-1" cuando las células foliculares tiroideas eran estimuladas con interferón γ , interleucina 1 y factor de necrosis tumoral, y que el anticuerpo anti-"ICAM-1" inhibía la formación de grupos de células foliculares y células mononucleares (Weetman, A. P. y col., *Eur. J. Immunol.*, Vol. 20, p.271 (1990)).

Se cree que en la hepatitis aumentan las posibilidades de adhesión entre hepatocitos y células inflamatorias, puesto que hay dos rutas de adhesión "ICAM-1" y "LFA-3", y "LFA-1" y "CD2", para promover de esta forma la presentación de antígenos y la activación de células inflamatorias. En particular, en la hepatitis B, las moléculas "LFA-3" se expresan mucho en los hepatocitos en los que los virus proliferan activamente, y "ICAM-1" se correlaciona con el grado de la hepatitis. Esto implica, por lo tanto, que "LFA-3" está implicado en la exclusión de virus y "ICAM-1" promueve las células T para presentar antígeno y regula la reacción de inflamación. En los hepatocitos "ICAM-1" negativos y antígenos HBc positivos, se puede producir infección crónica por virus, un tipo de inmunorreactividad debido a la falta de interacción entre linfocitos y hepatocitos. También se ha descrito que "ICAM-1" del suero en la enfermedad hepática crónica se puede correlacionar con el grado de daño de los hepatocitos porque las concentraciones de "ICAM-1" en el suero en los pacientes de hepatitis aguda, pacientes de hepatitis activa crónica, y pacientes de cirrosis hepática, eran mayores que en los voluntarios sanos y en los pacientes de hepatitis crónica persistente, y la concentración era mayor en el caso de hepatitis activa que avanza histológicamente (*Mod. Phys.*, Vol. 15, No.1, pp.73-76 (1995)).

En un modelo animal de arteriosclerosis, se observó la adhesión e invasión de monocitos y linfocitos al endotelio vascular en etapas muy tempranas del inicio de la enfermedad. Por lo tanto, se cree que la interacción de estos hemocitos con el endotelio es la primera etapa en el inicio de la arteriosclerosis. Diferentes publicaciones muestran la expresión de las moléculas de adhesión en el nido de arteriosclerosis real que incluye la expresión de "ICAM-1" en el nido de arteriosclerosis humana (Poston, R. N. y col., *Am. J. Pathol.*, Vol. 140, p.665 (1992)) y la expresión de "VCAM-1" en el nido de arteriosclerosis de un conejo con hipercolesterolemia (Cybulsky, M. I. & Gimbrone, M. A. Jr., *Science*, Vol. 251, p.788 (1991)). Una publicación reciente puso de manifiesto que se observaba la expresión de "VCAM-1" en el nido de arteriosclerosis humana, y en particular, expresión fuerte en las células musculares lisas que migran a la íntima y en los monocitos/macrófagos. Además se potenciaba la expresión de "MC-1" en el nido de arteriosclerosis de conejo y humana, sugiriendo que "MCP-1" promueve la formación del nido de arteriosclerosis por la migración de monocitos/macrófagos (*Current Therapy*, Vol. 12, No.8 pp.1485-1488 (1994)).

También se ha publicado la relación entre la metástasis tumoral y la anomalía de las moléculas de adhesión. Por ejemplo, las células de cáncer con menor caderina E mostraron una fuerte invasividad, pero la invasividad era inhibida introduciendo el ADNc de la caderina E en las células de cáncer, y se recuperaba la invasividad cuando se añadía antisuero de caderina E a la células. Esto sugiere una estrecha relación entre la disminución de la expresión de caderina E y la invasividad de las células tumorales (Frixen, U. H. y col., Vol. 113, p.173 (1991)). En los casos clínicos reales, se destaca la relación entre la disminución de la expresión de caderina E y la metástasis en diferentes tipos de cáncer tales como hepatoma, cáncer esofágico, cáncer gástrico y cáncer de pecho. También se ha descrito que las moléculas "VLA-4", un ligando para "VCAM-1", se expresaban altamente en el melanoma metastático, cáncer gástrico y cáncer de pecho, lo que sugería que esta molécula se podía usar para la implantación en células endoteliales vasculares en la metástasis. Además, basándose en experimentos usando diferentes líneas de células tumorales, se ha publicado que el cáncer epitelial, tal como el cáncer gástrico, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, hepatoma o cáncer pancreático, se adhieren a las células endoteliales vasculares por la selectina E (Takada, A. y col., *Cancer Res.*, Vol. 53, p.354 (1993)).

Por otra parte, se ha hecho un enfoque terapéutico para tratar enfermedades dirigiendo estas moléculas de adhesión. Por ejemplo, se ha publicado que el anticuerpo anti-"ICAM-1" de rata inhibe fuertemente la reacción inflamatoria en el modelo de artritis autoinmune de rata. También se ha descrito que la administración del anticuerpo anti-"ICAM-1" inhibía el inicio de la artritis en la sinovitis adyuvante en uno de los modelos de AR (Nihon Rinsho Merieki Gakkai Kaishi, Vol. 14, No.6, pp.571-577 (1991)). Se ha publicado además, que la formación de metástasis de tumor inoculado era inhibido notablemente si se administraba una gran cantidad de péptidos que tenían la secuencia REG, que es una secuencia de aminoácidos en una proteína de matriz extracelular reconocida y que unen algunas integrinas, a un ratón con cáncer de vesícula biliar, y que en sistemas *in vitro* los péptidos RGD y el anticuerpo anti-subunidad $\beta 1$ inhibía el movimiento y la infiltración de células tumorales (Yamada, K. M. y col., *Cancer Res.*, Vol. 50, p.4485, (1990)).

A continuación se describe la invención con detalle, aclarando el significado de la terminología usada en el presente documento y los procedimientos generales de producción de polipéptidos, polipéptidos de fusión, genes, anticuerpos, ratón transgénico y ratón silenciado de la presente invención. Sin embargo, no es necesario decir que los significados de la terminología no deben interpretarse como limitados por la definición dada en el presente documento.

"Mitógeno" usado en el presente documento también se llama factor mitógeno y significa una sustancia que induce la división celular. Desde el punto de vista inmunológico significa una sustancia que induce blastogénesis de los linfocitos policlonalmente y que induce división celular. Son ejemplos del mismo lectinas tales como PHA y PWM, concanavalina A (ConA), lipopolisacáridos, estreptolisina S y anticuerpo anti-linfocitos. Se sabe que la concanavalina A y PHA actúan sólo en los linfocitos T, que los lipopolisacáridos actúan sólo en los linfocitos B y que PWM actúa en ambos linfocitos.

La expresión “célula linfoblasto” usada en el presente documento también se llama un linfocito grande, linfoblasto o inmunoblasto, y significa un linfocito que pertenece a un linfocito grande entre los linfocitos que existen en los tejidos linfoides (nódulo linfático, bazo, timo, médula ósea, conducto linfático, amígdala, etc.) y la sangre.

La expresión “linfocito activado” usada en el presente documento significa, por ejemplo, un linfocito mencionado a continuación, pero no se limita al mismo. Por ejemplo, la expresión significa un linfocito activado por alguna estimulación. Como se ha mencionado antes, los linfocitos se clasifican en células T, células B y linfocitos agresores naturales. Las células T se clasifican en células CD4 positivas y células CD8 positivas. Por lo tanto, los “linfocitos activados” de la presente invención incluyen principalmente células T activadas, células B activadas y células asesinas activadas, y las células T activadas incluyen células CD4 positivas activadas y células CD8 positivas activadas.

Tras reaccionar con antígenos presentados por células presentadoras de antígeno las células CD4 positivas segregan diferentes citocinas, receptores recién expresados por estas citocinas, aumentan su propio tamaño, empiezan la división celular, proliferan y son activadas. Las células T CD4 positivas activadas incluyen las que están en dicho estado.

Las células T CD8 positivas expresan IL-2R cuando reaccionan con antígenos. Cuando la IL-2 actúa en el IL-2R, las células se diferencian en CTL, que tienen citotoxicidad celular. Los CTL destruyen sus células objetivo para matarlas cuando encuentran el mismo complejo de péptido antígeno/MHC de clase I. Cuando las células T CD8 positivas se diferencian en CTL, aumentan los gránulos en el citoplasma. Estos gránulos comprenden diferentes proteínas de alto peso molecular, representadas por la perforina. La perforina se parece a MAC compuesta de cinco a nueve componentes de complemento, y hace agujeros en la membrana celular de las células objetivo. Los gránulos también comprenden serina proteasas, LT y proteoglicanos. Si las células CD8 positivas reciben estimulación de antígeno y se diferencian en CTL, también segregan linfocinas tales como IFN γ , LT, TNF o IL-2. Las células T CD8 positivas activadas incluyen las de dicho estado.

Las células T muestran el fenómeno de formación de blastos cuando reaccionan con hemaglutinina (fitohemaglutinina, PHA) o concanavalina A (ConA). Las células T activadas incluyen las de dicho estado.

Las células B expresan moléculas B7, activan células T auxiliares por estimulación de CD28 en su superficie con TCR, permiten que las células T auxiliares expresen CD40L o produzcan linfocinas. Cuando las células reciben estimulación, cambian para expandir su tamaño celular o proliferar. Las células B activadas incluyen las de dicho estado. En la presente invención, las células B activadas incluyen las que segregan anticuerpos (células que segregan anticuerpos y células del plasma).

Células asesinas activadas significa los que muestran acción citotóxica en las células tumorales o células infectadas por virus como se ha mencionado antes. En la presente invención, los linfocitos activados incluyen células del timo estimuladas por concanavalina A (ConA).

La “célula linfoblasto activada” usada en el presente documento incluye un “linfoblasto” activado que se genera cuando el linfoblasto mencionado antes se estimula con el “mitógeno” mencionado antes tal como la concanavalina A.

La expresión “linfocito en reposo” usada en el presente documento, significa en algún caso, un linfocito no activado, que no ha recibido la estimulación para activar células, a diferencia de un linfocito activado mencionado antes.

El “gen” de la presente invención incluye un ADN genómico y un ADNc.

La sustancia “derivada de ser humano” de la presente invención incluye sustancia natural aislada de un componente del cuerpo humano (órgano, tejido, célula, fluido corporal, etc.), y sustancia recombinante producida por tecnología de ADN recombinante. Cuando la sustancia es proteína o polipéptido, la sustancia incluye una proteína artificial y polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen, eliminan o añaden uno o más aminoácidos.

La “molécula de superficie celular” de la presente invención es la derivada de ser humano.

Específicamente, la “molécula de superficie celular” de la presente invención se caracteriza por tener, al menos, las propiedades descritas antes.

(a) la molécula de superficie celular se expresa, al menos, en timocitos y células linfoblasto estimuladas por mitógeno;

(b) un anticuerpo reactivo con la molécula de superficie celular induce adhesión entre las células linfoblasto estimuladas por mitógeno;

(c) un anticuerpo reactivo con la molécula de superficie celular induce proliferación de linfocitos de la sangre periférica en presencia de un anticuerpo contra CD3;

(d) la molécula de superficie celular tiene una secuencia de aminoácidos parcial representada por Phe-Asp-Pro-Pro-Phe en su región extracelular; y

ES 2 285 763 T3

(e) la molécula de superficie celular tiene una secuencia de aminoácidos parcial representada por Tyr-Met-Phe-Met en su región citoplasmática.

Preferiblemente, la “molécula de superficie celular” comprende el siguiente “polipéptido” de la presente invención. El polipéptido de la invención que se describe en el presente documento con más detalle es un “polipéptido” que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, que constituye una “molécula de superficie celular” como se describe a continuación. Son ejemplos de la misma los siguientes.

(1) Un polipéptido codificado por un ADN que hibrida con un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas;

(2) Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 60% o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(3) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado);

(4) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 26 a 625 de SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado);

(5) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 35 a 637 de SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 de rata” y su derivado);

(6) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 1 a 603 de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 de ratón” y su derivado);

(7) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 35 a 685 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “mutante del antígeno JTT-1 de rata” y su derivado); y

(8) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ADN que codifica un polipéptido que constituye la molécula de superficie celular de la presente invención, en el que el ADN se introduce en el transformante identificado por un nº de acceso del depósito internacional FERM BP-5725, o que tiene la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado).

Son ejemplos de “condiciones restrictivas” las siguientes. Cuando se usa una sonda con 50 o más nucleótidos y se lleva a cabo la hibridación en NaCl al 0,9%, el estándar de temperatura a la que se produce el 50% de disociación (T_m) se calcula usando la siguiente fórmula y la temperatura para la hibridación se puede determinar de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$T_m = 82,3^{\circ}\text{C} + 0,41 \times (G + C)\% - 500/n - 0,61 \times (\text{formamida})\%$$

(n significa el número de nucleótidos de la sonda).

Temperatura = $T_m - 25^{\circ}\text{C}$.

Además, cuando se usa una sonda con 100 o más nucleótidos ($G+C = 40$ a 50%), se debe considerar que T_m varía como (1) y (2) mencionados a continuación.

(1) T_m disminuye aproximadamente 1°C por 1% de apareamiento erróneo.

(2) T_m disminuye $0,6$ a $0,7^{\circ}\text{C}$ por 1% de formamida.

Por consiguiente, las condiciones de temperatura para la combinación de cadenas completamente complementarias se pueden exponer como sigue.

(A) 65 a 75°C (sin añadir formamida)

(B) 35 a 45°C (en presencia de formamida al 50%)

ES 2 285 763 T3

Las condiciones de temperatura para la combinación de cadenas complementarias de forma incompleta se pueden exponer como sigue.

(A) 45 a 55°C (sin añadir formamida)

(B) 35 a 42°C (en presencia de formamida al 30%)

Las condiciones de temperatura cuando se usa una sonda con 23 o menos nucleótidos, puede ser 37°C o se puede calcular usando la siguiente fórmula.

$$\text{Temperatura} = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{el número de A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{el número de C} + \text{G}) - 5^{\circ}\text{C}$$

Aquí, “que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos” significa que incluye un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que múltiples aminoácidos, preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, en particular preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos mostrada en la lista de secuencias, se sustituyen, eliminan y/o modifican, y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos en la que múltiples aminoácidos, preferiblemente 1 a 10 aminoácidos, en particular preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, se añaden a la secuencia de aminoácidos mostrada en la lista de secuencias, siempre que el polipéptido tenga sustancialmente las mismas propiedades biológicas que el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la lista de secuencias.

Dicha sustitución, delección o inserción de aminoácidos se puede realizar por el procedimiento habitual (*Experimental Medicine*: SUPPLEMENT, “Handbook of Genetic Engineering” (1992); etc.).

Son ejemplos de los mismos mutagénesis dirigidas por oligonucleótido sintético (procedimiento de dúplex discontinuo), mutagénesis puntual por la cual se introduce una mutación puntual aleatoriamente por tratamiento con nitrito o sulfito, el procedimiento por el cual se prepara un mutante por delección con la enzima Ba131 y similares, mutagénesis de casete, procedimiento de barrido con conector, procedimiento de incorporación errónea, procedimiento de apareamiento erróneo de cebador, procedimiento de síntesis de segmento de ADN, etc.

La mutagénesis dirigida por oligonucleótido sintético (procedimiento de dúplex discontinuo) se puede llevar a cabo, por ejemplo, como sigue. Se clona la región que se desea mutagenizar en el vector fago M13 que tiene la mutación ámbar para preparar el ADN de fago monocatenario. Después de linearizar el ADN de RF I del vector M13 sin mutación ámbar por tratamiento con enzimas de restricción, el ADN se mezcla con el ADN de fago monocatenario mencionado antes, desnaturalizado, y después se reasocia formando el “ADN dúplex discontinuo”. Se hibrida un oligonucleótido sintético en el que se introducen las mutaciones con el ADN dúplex discontinuo y los ADN bicatenarios circulares cerrados se preparan por las reacciones con la ADN polimerasa y ADN ligasa. Se transfectan con ese ADN células MutS de *E. coli* deficientes en actividad de reparación de apareamientos erróneos. Las células de *E. coli* sin actividad supresora se infectan con los fagos cultivados, y se seleccionan sólo los fagos sin la mutación ámbar.

El procedimiento mediante el cual se introduce una mutación puntual con nitrito, usa, por ejemplo, el principio mencionado a continuación. Si se trata ADN con nitritos, las bases se desaminan para cambiar adenina en hipoxantina, citosina en uracilo y guanina en xantina. Si el ADN desaminado se introduce en las células, los “A:T” y “G:C” se sustituyen por “G:C” y “A:T”, respectivamente, porque la hipoxantina, el uracilo y la xantina forman pares de bases con la citosina, la adenina y la timina, respectivamente, en la replicación del ADN. Realmente, los fragmentos de ADN monocatenarios tratados con nitrito hibridan con el “ADN dúplex discontinuo”, y después las cepas mutantes se separan por manipulación de la misma forma que en la mutagénesis dirigida por oligonucleótido sintético (procedimiento de dúplex discontinuo).

Los códigos alfabéticos de tripletes o de una sola letra usados para representar los aminoácidos en la presente memoria descriptiva o las figuras significan los siguientes aminoácidos. (Gly/G) glicina, (Ala/A) alanina, (Val/V) valina, (Leu/L) leucina, (Ile/I) isoleucina, (Ser/S) serina, (Thr/T) treonina, (Asp/D) ácido aspártico, (Glu/E) ácido glutámico, (Asn/N) asparagina, (Gln/Q) glutamina, (Lys/K) lisina, (Arg/R) arginina, (Cys/C) cisteína, (Met/M) metionina, (Phe/F) fenilalanina, (Tyr/Y) tirosina, (Trp/W) triptófano, (His/H) histidina, (Pro/P) prolina.

El “polipéptido” que constituye la “molécula de superficie celular” mencionada como se describe en el presente documento es una proteína transmembrana, que penetra la membrana celular, y la “molécula de superficie celular” está compuesta de uno o dos de estos polipéptidos transmembrana.

Aquí, una “proteína transmembrana” significa una proteína que conecta con la membrana a través de la región peptídica hidrófoba penetrando la bicapa lipídica de la membrana una o varias veces y cuya estructura, en conjunto, está compuesta de tres regiones principales, es decir, la región extracelular, la región transmembrana y la región citoplasmática, como se ve en muchos receptores o moléculas de superficie celular. Dicha proteína transmembrana integra cada receptor o molécula de superficie celular en forma de un monómero, homodímero, heterodímero u oligómero con otra u otras cadenas que tienen la misma o diferente secuencia de aminoácidos.

El “fragmento polipeptídico” descrito en el presente documento es un fragmento del “polipéptido” definido antes de la presente invención y preferiblemente la región extracelular del polipéptido. Si se desea, se pueden añadir uno a cinco aminoácidos al extremo N y/o al extremo C de esta región.

Aquí, una “región extracelular” significa el conjunto o una parte de la estructura parcial (región parcial) de la estructura entera de la proteína transmembrana mencionada, donde la estructura parcial existe fuera de la membrana. En otras palabras, significa el conjunto o una parte de la región de la proteína transmembrana excepto la región incorporada en la membrana (región transmembrana) y la región que existe en el citoplasma después de la región transmembrana (región citoplasmática).

“La región constante o una parte de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Ig)” usada en el presente documento, significa la región constante de la región Fc de la cadena pesada de inmunoglobulina derivada de ser humano (cadena H) descrita, o una parte de la misma. La inmunoglobulina puede ser cualquier inmunoglobulina que pertenece a cualquier clase y cualquier subclase. Específicamente, los ejemplos de inmunoglobulinas son IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA (IgA1 e IgA2), IgD e IgE. Preferiblemente, la inmunoglobulina es la IgG (IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) o IgM. Son ejemplos de inmunoglobulinas particularmente preferidas de la presente invención las que pertenecen a la IgG derivada de ser humano (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

La inmunoglobulina tiene una unidad estructural en forma de Y en la que cuatro cadenas compuestas de dos cadenas ligeras homólogas (cadenas L) y dos cadenas pesadas homólogas (cadenas H) están conectadas por enlaces disulfuro (enlaces S-S). La cadena ligera está compuesta de la región variable de la cadena ligera (VL) y la región constante de la cadena ligera (CL). La cadena pesada está compuesta de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región constante de la cadena pesada (CH).

La región constante de la cadena pesada está compuesta de algunos dominios que tienen la secuencia de aminoácidos inherente a cada clase (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) y cada subclase (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2).

La cadena pesada de la IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) está compuesta de VH, dominio CH1, región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 en este orden desde el extremo N.

Igualmente, la cadena pesada de la IgG1 está compuesta de VH, dominio $C\gamma_11$, región bisagra, dominio $C\gamma_12$ y dominio $C\gamma_13$ en este orden desde el extremo N. La cadena pesada de la IgG2 está compuesta de VH, dominio $C\gamma_21$, región bisagra, dominio $C\gamma_22$ y dominio $C\gamma_23$ en este orden desde el extremo N. La cadena pesada de la IgG3 está compuesta de VH, dominio $C\gamma_31$, región bisagra, dominio $C\gamma_32$ y dominio $C\gamma_33$ en este orden desde el extremo N. La cadena pesada de la IgG4 está compuesta de VH, dominio $C\gamma_41$, región bisagra, dominio $C\gamma_42$ y dominio $C\gamma_43$ en este orden desde el extremo N.

La cadena pesada de la IgA está compuesta de VH, dominio $C\alpha_1$, región bisagra, dominio $C\alpha_2$ y dominio $C\alpha_3$ en este orden desde el extremo N.

Igualmente, la cadena pesada de la IgA1 está compuesta de VH, dominio $C\alpha_11$, región bisagra, dominio $C\alpha_12$ y dominio $C\alpha_13$ en este orden desde el extremo N. La cadena pesada de la IgA2 está compuesta de VH, dominio $C\alpha_21$, región bisagra, dominio $C\alpha_22$ y dominio $C\alpha_23$ en este orden desde el extremo N.

La cadena pesada de la IgD está compuesta de VH, dominio $C\delta_1$, región bisagra, dominio $C\delta_2$ y dominio $C\delta_3$ en este orden desde el extremo N.

La cadena pesada de la IgM está compuesta de VH, dominio $C\mu_1$, dominio $C\mu_2$, dominio $C\mu_3$ y dominio $C\mu_4$ en este orden desde el extremo N y no tiene región bisagra como se ve en IgG, IgA e IgD.

La cadena pesada de la IgE está compuesta de VH, dominio $C\varepsilon_1$, dominio $C\mu_2$, dominio $C\varepsilon_3$ y dominio $C\varepsilon_4$ en este orden desde el extremo N y no tiene región bisagra como se ve en IgG, IgA e IgD.

Si la IgG se trata, por ejemplo, con papaína, se escinde en el lado ligeramente N terminal más allá de los enlaces disulfuro que existen en la región bisagra donde los enlaces disulfuro conectan las dos cadenas pesadas para generar dos Fab homólogos, en los que un fragmento de cadena pesada compuesta de VH y CH1 está conectada con una cadena ligera por un enlace disulfuro, y un Fc, en el que los dos fragmentos de cadena pesada homólogos compuestos de la región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, están conectados por enlaces disulfuro (véase, “Immunology Illustrated”, original 2nd ed., Nankodo, pp.65-75 (1992); y “Focus of Newest Medical Science ”Recognition Mechanism of Immune System”, Nankodo, pp.4-7 (1991); etc.).

Concretamente, “una parte de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina” como se describe en el presente documento, significa una parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene las características estructurales mencionadas, y preferiblemente es la región constante sin el dominio C1, o la región Fc. Específicamente, sus ejemplos son la región compuesta de la región bisagra, dominio C2 y dominio C3 de cada IgG, IgA e IgD, y son la región compuesta del dominio C2, dominio C3 y dominio C4 de cada una de la IgM e IgE. Un ejemplo particularmente preferido de la misma es la región Fc de la IgG1 derivada de ser humano.

El “polipéptido de fusión” descrito en el presente documento está compuesto de la región extracelular del “polipéptido” que constituye la “molécula de superficie celular” descrita antes y una “región constante o una parte de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) humana”. Preferiblemente, es un polipéptido de fusión compuesto de una región extracelular de un polipéptido descrito en el presente documento y una parte de una región

constante de la cadena pesada de la IgG humana, y en particular preferiblemente, es un polipéptido de fusión compuesto de una región extracelular de un polipéptido descrito en el presente documento y la región (Fc) compuesta de una región bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de la cadena pesada de la IgG humana. Además, se prefiere la IgG1 entre las IgG. Además se prefiere como el polipéptido descrito en el presente documento un polipéptido derivado de ser humano, ratón o rata (preferiblemente, ser humano).

El polipéptido de fusión descrito en el presente documento tiene la ventaja de que el polipéptido de fusión se puede purificar de forma extremadamente fácil usando la cromatografía en columna de afinidad usando la propiedad de la proteína A que se une específicamente al fragmento de inmunoglobulina porque el polipéptido de fusión tiene una parte de la región constante (por ejemplo Fc) de una inmunoglobulina, tal como IgG como se ha mencionado antes, como pareja de fusión. Además, puesto que están disponibles diferentes anticuerpos contra el Fc de diferentes inmunoglobulinas, se puede llevar a cabo fácilmente un inmunoensayo para los polipéptidos de fusión con anticuerpos contra Fc.

El polipéptido de la presente invención, fragmentos de polipéptido y polipéptidos de fusión descritos en el presente documento, se pueden producir no sólo por la tecnología de ADN recombinante mencionada a continuación, si no también por un procedimiento bien conocido en la técnica tal como un procedimiento sintético químico y un procedimiento de cultivo celular o un procedimiento modificado de este. El polipéptido de la invención consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2.

El “gen” comprende un ADN que codifica el polipéptido o fragmento de polipéptido mencionado, e incluye cualquier gen que tenga una secuencia de nucleótidos que codifique el polipéptido o fragmento de polipéptido descrito en el presente documento.

A continuación se mencionan ejemplos del gen que codifica el polipéptido o fragmento de polipéptido descrito antes.

(1) Un polipéptido codificado por un ADN que hibrida con un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 en condiciones restrictivas;

(2) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 60% o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(3) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado);

(4) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 26 a 625 de SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado);

(5) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 35 a 637 de SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 de rata” y su derivado);

(6) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 1 a 603 de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 de ratón” y su derivado);

(7) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que corresponde a los restos nucleótidos 35 a 685 de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “mutante del antígeno JTT-1 de rata” y su derivado); y

(8) Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ADN que codifica un polipéptido que constituye la molécula de superficie celular de la presente invención, en el que el ADN se introduce en el transformante identificado por un nº de acceso del depósito internacional FERM BP-5725, o que tiene la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos (es decir, un polipéptido que constituye el “antígeno JTT-1 humano” y su derivado).

Aquí, “sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos” tiene el significado dado antes.

Los ejemplos específicos del gen de la presente invención son genes que comprenden una molécula de ácido nucleico como se menciona a continuación.

(1) Un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1;

(2) Un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de los restos nucleótidos 26-265 de SEQ ID NO: 3;

(3) Un ADN que codifica un polipéptido que constituye una molécula de superficie celular de la presente invención, en el que el ADN se introduce en un transformante identificado por un n° de acceso del depósito internacional FERM BP-5725.

5 El ADN que codifica una parte de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que es una parte de un polipéptido de fusión descrito en el presente documento, puede ser ADNc o ADN genómico compuesto de intrones entre cada exón (el ADN que codifica, por ejemplo, el dominio CH1, región bisagra, dominio CH2, dominio CH3, dominio CH4, etc.).

10 El ADN de la presente invención incluye cualquier ADN compuesto de cualesquiera codones siempre que los codones codifiquen los mismos aminoácidos.

15 El ADN de la presente invención puede ser un ADN obtenido por cualquier procedimiento. Por ejemplo, el ADN incluye el ADN complementario (ADNc) preparado a partir de ARNm, el ADN preparado a partir de ADN genómico, el ADN preparado por síntesis química, el ADN obtenido por amplificación por PCR con ARN o ADN como molde, y un ADN construido combinando adecuadamente estos procedimientos.

20 El ADN que codifica el polipéptido de la presente invención se puede obtener por el procedimiento habitual, tal como un procedimiento de clonar el ADNc a partir del ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención, un procedimiento para aislar el ADN genómico y después religación, síntesis química, etc.

(1) El ADNc se puede clonar a partir del ARNm que codifica el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, por el procedimiento descrito a continuación.

25 Primero, se prepara el ARNm que codifica una molécula de superficie celular (polipéptido) de la presente invención a partir de tejidos o células (por ejemplo, células de timo o células linfoblasto derivadas del bazo estimuladas con ConA) que expresan y producen una molécula de superficie celular (polipéptido) de la presente invención. El ARNm se puede preparar aislando el ARN total por un procedimiento conocido tal como el procedimiento de tiocianato de guanidina (Chirgwin, J.M. y col., *Biochemistry*, Vol. 18, p 5294, 1979), procedimiento del fenol caliente, o procedimiento de AGPC, y sometiéndolo a cromatografía de afinidad usando oligo-dT-celulosa o poli-U-sefarsa.

30 Después, con el ARNm obtenido como molde, se sintetiza el ADNc, por ejemplo, por un procedimiento conocido usando transcriptasa inversa, como el procedimiento de Okayama y col. (*Mol. Cell. Biol.* Vol. 2, p.161 (1982); *Ibid.* Vol. 3, p.280 (1983)) o el procedimiento de Hoffman y col. (*Gene* Vol. 25, p.263 (1983)), y se convierte en ADNc bi-catenario. Se prepara una biblioteca de ADNc transformando *E. coli* con vectores plásmidos, vectores fagos o vectores cósmidos que tienen este ADNc o transfectando *E. coli* después del empaquetamiento *in vitro*.

40 Los vectores plásmidos usados en esta invención no se limitan siempre que se repliquen y mantengan en los hospedantes. También se puede usar cualquier vector fago que se pueda replicar en hospedantes. Son ejemplos de vectores de clonación usados normalmente pME18S, AZAPII(1ZAPII), pUC19, λ gt10, λ gt11, etc. Cuando el vector se aplica al cribado inmunológico mencionado a continuación, preferiblemente se usa el vector que tiene un promotor que puede expresar un gen que codifica el polipéptido de la presente invención en un hospedante.

45 El ADNc se puede insertar en un plásmido, por ejemplo, por el procedimiento de Maniatis y col. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.1.53, 1989). El ADNc se puede insertar en un vector fago, por ejemplo, por el procedimiento de Hyunh y col. (*DNA cloning, a practical approach*, Vol. 1, p.49 (1985)). Estos procedimientos se pueden llevar a cabo simplemente usando un kit de clonación disponible en el comercio (por ejemplo, un producto de Takara Shuzo). El plásmido recombinante o vector fago obtenido se introduce en las células hospedante adecuadas tal como una procariota (por ejemplo, *E. coli*: XLIBlue MRF', DH5 α , HB101, MC1061/P3, etc.).

50 Son ejemplos de un procedimiento para introducir un plásmido en un hospedante el procedimiento de cloruro de calcio, procedimiento de cloruro de calcio/cloruro de rubidio descrito en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1.74 (1989)), y el procedimiento de electroporación. Los vectores fago se pueden introducir en células hospedantes, por ejemplo, por un procedimiento en el que se introducen ADN de fagos en hospedantes en crecimiento después de empaquetamiento *in vitro*. El empaquetamiento *in vitro* se puede llevar a cabo fácilmente con un kit de empaquetamiento *in vitro* disponible en el comercio (por ejemplo, un producto de Stratagene o Amersham).

60 El ADNc que codifica el polipéptido de la presente invención se puede aislar de la biblioteca de ADNc así preparada según el procedimiento mencionado antes, combinando procedimientos de cribado de ADNc generales.

65 Por ejemplo, se puede cribar un clon que comprende el ADNc por un procedimiento de hibridación de colonias conocido (Crunstein y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 72, p.3961 (1975)) o el procedimiento de hibridación en placa (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, p.2.108 (1989)) usando oligonucleótidos químicamente sintetizados marcados con ³²P como sondas, que corresponden a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención. Alternativamente, se puede cribar un clon que tiene un

fragmento de ADN que codifica una región específica en el polipéptido de la presente invención por amplificación de la región por PCR con cebadores sintéticos de la PCR.

Cuando se usa una biblioteca de ADNc preparada usando un vector de expresión de ADNc (por ejemplo, vector fago λ ZAPII), el clon deseado se puede cribar por la reacción de antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo contra el polipéptido de la presente invención. Se usa preferiblemente un procedimiento de cribado que usa el procedimiento de la PCR cuando se someten a cribado muchos clones.

La secuencia de nucleótidos del ADN así obtenido se puede determinar por el procedimiento de Maxam-Gilbert (Maxam y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 74, p.560 (1977)) o el procedimiento de terminación de cadena sintética de didesoxinucleótidos usando el fago M13 (Sanger y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 74, pp.5463-5467 (1977)). El gen entero o una parte del gen que codifica el polipéptido de la presente invención se puede obtener escindiendo el clon obtenido como se ha mencionado antes con enzimas de restricción y similares.

(2) El ADN que codifica el polipéptido de la presente invención se puede aislar del ADN genómico derivado de las células que expresan el polipéptido de la presente invención como se ha mencionado antes por los siguientes procedimientos.

Dichas células se solubilizan preferiblemente por SDS o proteinasa K, y los ADN se desproteinizan por extracción en fenol repetida. Los ARN se hacen digerir preferiblemente con ribonucleasa. Los ADN obtenidos se hacen digerir parcialmente con las enzimas de restricción adecuadas, y los fragmentos de ADN obtenidos se amplifican con el fago o cósmido adecuado para generar una biblioteca. Después, se detectan los clones que tienen la secuencia deseada, por ejemplo, usando sondas de ADN marcadas radiactivamente, y se obtiene el gen entero o una parte del gen que codifica el polipéptido de la presente invención a partir de los clones por escisión con enzimas de restricción y similares.

El ADNc que codifica un polipéptido derivado de ser humano se puede obtener como sigue. Después de preparar una biblioteca de cósmidos en los que se ha introducido el ADN genómico humano (ADN cromosómico) ("Laboratory Manual: Human Genome Mapping", Maruzen press), se obtienen clones positivos que comprenden el ADN de la región codificadora de la proteína deseada cribando la biblioteca de cósmidos. Después, la biblioteca de ADNc mencionada antes se criba con el ADN codificante escindido del clon positivo como sonda para preparar el ADNc humano.

(3) El ADN de la presente invención también se puede sintetizar químicamente por el procedimiento habitual, basado en la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 1 ó 3.

La presente invención también se refiere a un vector recombinante que comprende el ADN que codifica el polipéptido mencionado de la presente invención. El vector recombinante de la presente invención no está limitado siempre que se pueda replicar y mantener o se pueda replicar de forma autónoma en diferentes hospedantes procariotas y/o eucariotas. El vector de la presente invención incluye vectores plásmidos y vectores fagos.

El vector recombinante se puede preparar fácilmente ligando el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención con un vector por recombinación disponible en la técnica (ADN plásmido y ADN bacteriófago) por el procedimiento habitual. Los ejemplos específicos de los vectores usados para la recombinación son plásmidos derivados de *E. coli* tales como pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 y pUC19, plásmidos derivados de levaduras tales como pSH19 y pSH15, y plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* tales como pUB110, pTP5 y pC194. Son ejemplos de fagos un bacteriófago tal como el fago λ , y un virus de animal o insecto (pVL1393, Invitrogen) tal como un retrovirus, virus vacuna y virus de la polihedrosis nuclear.

Un vector de expresión es útil para expresar el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención y para producir el polipéptido de la presente invención. El vector de expresión no está limitado siempre que exprese el gen que codifica el polipéptido de la presente invención en diferentes células hospedantes procariotas y/o eucariotas y produzca esta proteína. Los ejemplos de los mismos son pEFneo (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp.158-162 (1994)), pEF-BOS (*Nucleic Acids Res.* Vol. 18, p.5322 (1990)), pME18S (*Experimental Medicine: SUPPLEMENT, "Handbook of Genetic Engineering"* (1992)), pMAL C2, y similares.

Cuando se usan bacterias, en particular *E. coli*, como células hospedantes, un vector de expresión está compuesto en general, al menos, de una región de promotor/operador, un codón de iniciación, el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención, codón de terminación, región terminadora y replicón.

Cuando se usan levaduras, células animales o células de insectos como hospedantes, un vector de expresión está compuesto preferiblemente, al menos, de un promotor, un codón de iniciación, el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención, y un codón de terminación. También puede comprender el ADN que codifica un péptido señal, secuencia potenciadora y región 5'- y 3'-no traducida del gen que codifica el polipéptido de la presente invención, zonas de religación, sitio de poliadenilación, región de marcador seleccionable y replicón. El vector de expresión también puede contener, si es necesario, un gen para la amplificación de gen (marcador) que se usa normalmente.

Una región de promotor/operador para expresar el polipéptido de la presente invención en bacterias comprende un promotor, un operador, una secuencia Shine-Dalgarno (SD) (por ejemplo, AAGG). Por ejemplo, cuando el hospedante

es *Escherichia*, preferiblemente comprende el promotor Trp, promotor lac, promotor recA, promotor λ PL, promotor lpp, promotor tac, o similares. Los ejemplos de un promotor para expresar el polipéptido de la presente invención en levaduras son el promotor PH05, promotor PGK, promotor GAP, promotor ADH, etc. Cuando el hospedante es *Bacillus*, son ejemplos del mismo el promotor SL01, promotor SP02, promotor penP, etc. Cuando el hospedante es una

5 célula eucariota tal como una célula de mamífero, son ejemplos del mismo el promotor derivado de SV40, promotor de retrovirus, promotor de choque térmico, promotor EF, etc., y preferiblemente SV-40, SR α y uno derivado de retrovirus. Como era de esperar, el promotor no está limitado a los ejemplos anteriores. Además, usar un potenciador es eficaz para la expresión.

10 Un codón de iniciación preferible es, por ejemplo, un codón de metionina (ATG).

El codón de terminación usado habitualmente (por ejemplo, TAG, TGA, TAA, etc.) se ilustra como un codón de terminación.

15 Normalmente se usan terminadores naturales o sintéticos como una región terminadora.

Un replicón significa un ADN capaz de replicar la secuencia de ADN entera en células hospedantes, e incluye un plásmido natural, un plásmido modificado artificialmente (fragmento de ADN preparado a partir de un plásmido natural), un plásmido sintético, etc. Ejemplos de plásmidos preferidos son pBR322 o sus derivados artificiales (fragmento

20 de ADN obtenido tratando pBR322 con enzimas de restricción adecuadas) para *E. coli*, plásmido 2 μ de levadura o ADN cromosómico de levadura para levaduras, y pEFneo, pME18S, pRSVneo ATCC 37198, pSV2dhfr ATCC 37145, pdBPV-MMTneo ATCC 37224, pSV2neo ATCC 37149, etc. para células de mamíferos.

También se puede usar una secuencia potenciadora, sitio de poliadenilación y zona de religación que se usan

25 normalmente en la técnica, tal como los derivados de SV40.

Se puede usar un marcador seleccionable usado habitualmente según el procedimiento habitual. Son ejemplos del mismo, genes de resistencia a antibióticos, tales como tetraciclina, neomicina, ampicilina o canamicina y gen de la

30 timidina quinasa.

Los ejemplos de un gen para la amplificación de genes son el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR), gen de la timidina quinasa, gen de resistencia a la neomicina, gen de la glutamato sintasa, gen de la adenosina desaminasa, gen de la ornitina descarboxilasa, gen de la higromicina-B-fosfotransferasa, gen de la aspartato transcarbamilasa,

35 etc.

El vector de expresión de la presente invención se puede preparar uniendo de forma continua y circular al menos el promotor mencionado, el codón de iniciación, el ADN (gen) que codifica el polipéptido de la presente invención, el codón de terminación y la región terminadora, a un replicón adecuado. Si se desea, se pueden usar fragmentos

40 de ADN adecuados (por ejemplo, conectores, sitios de restricción generados con otra enzima de restricción), por el procedimiento habitual tal como digestión con una enzima de restricción o ligación usando la T4 ADN ligasa.

Los transformantes de la presente invención se pueden preparar introduciendo el vector de expresión mencionado antes en células hospedantes.

45 Las células hospedantes usadas en la presente invención no están limitadas siempre que sean compatibles con un vector de expresión mencionado antes y se puedan transformar. Son ejemplos de las mismas diferentes células tales como células naturales o células recombinantes establecidas artificialmente usadas normalmente en el campo técnico de la presente invención (por ejemplo, bacterias (*Escherichia* y *Bacillus*), levaduras (*Saccharomyces*, *Pichia*, etc.), células animales o células de insecto.

50 Preferiblemente se usan *E. coli* o células animales. Los ejemplos específicos son *E. coli* (DH5 α , XL1Blue MRF', TB1, HB101, etc.), células derivadas de ratón (COP, L, C127, Sp2/0, NS-1, NIH3T3, etc.), células derivadas de rata, células derivadas de hámster (BHK, CHO-K1, CHO, etc.), células derivadas de mono (COS1, COS3, COS7, CV1, Velo, etc.), y células derivadas de ser humano (HEK293, Hela, células derivadas de fibroblatos diploides, mieloma,

55 Namalwa, etc.).

Se puede introducir un vector de expresión (transformado (transducido)) en células hospedantes por procedimientos conocidos.

60 La transformación se puede realizar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de Cohen y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 69, p.2110 (1972)), procedimiento de protoplastos (*Mol. Gen. Genet.*, Vol. 168, p.111 (1979)), o procedimiento competente (*J. Mol. Biol.*, Vol. 56, p.209 (1971)) cuando los hospedantes son bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), el procedimiento de Hinnen y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 75, p.1927 (1978)), o el procedimiento del litio (*J. Bacteriol.*, Vol. 153, p.163 (1983)) cuando el hospedante es *Saccharomyces cerevisiae*,

65 el procedimiento de Graham (*Virology*, Vol. 52, p.456 (1973)) cuando los hospedantes son células animales, y el procedimiento de Summers y col. (*Mol. Cell. Biol.*, Vol. 3, pp.2156-2165 (1983)) cuando los hospedantes son células de insectos.

El polipéptido de la presente invención se puede producir cultivando transformantes (en lo sucesivo este término incluye transductantes) que comprenden un vector de expresión preparado como se ha mencionado antes en medios nutrientes.

5 Los medios nutrientes preferiblemente comprenden fuente de carbono, fuente de nitrógeno inorgánico o fuente de nitrógeno orgánico necesarias para el crecimiento de las células hospedantes (transformantes). Los ejemplos de la fuente de carbono son glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa, y los ejemplos de la fuente de nitrógeno orgánico o inorgánico son sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, 10 torta de soja y extracto de patata. Si se desea, pueden comprender nutrientes (por ejemplo, una sal inorgánica (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio), vitaminas, antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina, canamicina, etc.).

El cultivo se lleva a cabo por un procedimiento conocido en la técnica. Las condiciones de cultivo tales como la temperatura, pH del medio y tiempo de cultivo se seleccionan adecuadamente de modo que haya sobreproducción del 15 polipéptido de la presente invención.

El medio y las condiciones de cultivo específicas usadas que dependen de las células hospedantes, se ilustran a continuación, pero no se limitan a ellos.

20 Cuando los hospedantes son bacterias, actinomicetos, levaduras, hongos filamentosos, son adecuados los medios líquidos que comprenden la fuente de nutrientes mencionada antes. Preferiblemente se usa el medio con pH 5 a 8.

Cuando el hospedante es *E. coli*, los ejemplos de medios preferidos son medio LB y medio M9 (Miller y col. *Exp. Mol. Genet.*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.431 (1972)). Usando estos medios, el cultivo se puede hacer 25 normalmente de 14 a 43°C, durante aproximadamente 3 a 24 horas, con aireación y agitación, si es necesario.

Cuando el hospedante es *Bacillus*, el cultivo se puede realizar normalmente de 30 a 40°C, durante aproximadamente 16 a 96 horas, con aireación y agitación, si es necesario.

30 Cuando el hospedante es una levadura, son ejemplos de medios el medio mínimo Burkholder (Bostian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, p.4505 (1980)). El pH del medio preferiblemente es 5 a 8. El cultivo se puede realizar normalmente de 20 a 35°C, durante aproximadamente 14 a 144 horas con aireación y agitación, si es necesario.

35 Cuando el hospedante es una célula animal, son ejemplos de medios el medio MEM que contiene de aproximadamente 5 a 20% de suero bovino fetal (*Science*, Vol. 122, p.501 (1952)), medio DMEM (*Virology*, Vol. 8, p.396 (1959)), medio RPMI1640 (*J. Am. Med. Assoc.*, Vol. 199, p.519 (1967)), y medio 199 (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol. 73, p.1 (1950)). El pH del medio preferiblemente es de aproximadamente 6 a 8. El cultivo se puede realizar normalmente de aproximadamente 30 a 40°C, durante aproximadamente 15 a 72 horas, con aireación y agitación, si es necesario.

40 Cuando el hospedante es una célula de insecto, un ejemplo de medio es el medio de Grace que contiene suero bovino fetal (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, p.8404 (1985)). Su pH preferiblemente es de aproximadamente 5 a 8. El cultivo se puede realizar normalmente de aproximadamente 20 a 40°C, durante 15 a 100 horas, con aireación y agitación, si es necesario.

45 El cultivo de los transformantes mencionados antes, en particular las células animales, puede sobreexpresar el polipéptido de la presente invención en la superficie de las células.

El polipéptido descrito en el presente documento se puede producir en forma de un fragmento de polipéptido soluble tal como un fragmento de región extracelular, preparando los transformantes como se ha mencionado antes 50 usando el ADN que codifica la región extracelular de cada dominio, y cultivando los transformantes para permitirles que segreguen el polipéptido soluble en el líquido sobrenadante del cultivo. Además, se puede preparar de forma similar un polipéptido de fusión descrito en el presente documento.

55 Concretamente, se obtiene un filtrado de cultivo (líquido sobrenadante) por un procedimiento tal como filtración o centrifugación del cultivo obtenido, y el polipéptido de la presente invención o un fragmento de polipéptido como se describe en el presente documento, se purifica y se aísla del filtrado del cultivo por el procedimiento habitual usado normalmente con el fin de purificar y aislar una proteína natural o sintética.

60 Son ejemplos del procedimiento de aislamiento y purificación un procedimiento que usa la solubilidad, tal como el procedimiento de precipitación por adición de sal y precipitación con disolvente, un procedimiento que usa la diferencia de peso molecular, tal como diálisis, ultrafiltración, filtración con gel, y electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida, un procedimiento que usa cargas, tal como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de hidroxilapatito, un procedimiento que usa la afinidad específica, tal como la cromatografía de afinidad, un procedimiento que usa la diferencia de hidrofobicidad, tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase 65 inversa, y un procedimiento que usa la diferencia de punto isoelectrico, tal como el enfoque isoelectrico.

Cuando el polipéptido de la presente invención o un fragmento de polipéptido como se describe en el presente documento existe en el periplasma o citoplasma de los transformantes cultivados, primero se recogen los cuerpos

fúngicos o células por el procedimiento habitual tal como filtración o centrifugación y se suspenden en el tampón adecuado. Después, la pared celular y/o membrana celular de las células y demás se rompen por un procedimiento tal como lisis con sonicación, lisozima y congelación-descongelación, y se obtiene la fracción de membrana que comprende el polipéptido de la presente invención por un procedimiento tal como centrifugación o filtración. La fracción de membrana se solubiliza con un detergente tal como Triton-X100 para obtener el extracto en bruto. Finalmente, el polipéptido o fragmento de polipéptido se aísla y se purifica del extracto en bruto por el procedimiento habitual ilustrado antes.

El “ratón transgénico” es un ratón transgénico en el que se ha integrado el ADN (ADNc o ADN genómico) preparado como se ha mencionado antes, que codifica el polipéptido descrito antes derivado de animales excepto de ratón (polipéptido no propio), en el locus endógeno del ratón. El ratón transgénico expresa el polipéptido no propio y segrega el polipéptido en su cuerpo.

El ratón transgénico se puede preparar de acuerdo con el procedimiento usado habitualmente para producir un animal transgénico (por ejemplo, véase, “Newest Manual of Animal Cell Experiment”, LIC press, Chapter 7, pp.361-408, (1990)).

Específicamente, por ejemplo, las células madre embrionarias (células ES) obtenidas de blastocitos de ratón normal se transforman con un vector de expresión en el que se ha insertado de forma operativa el gen que codifica el polipéptido derivado de ser humano de la presente invención (es decir, “antígeno JTT-1 humano”). Las células ES en las que se ha integrado el gen que codifica el polipéptido derivado de ser humano de la presente invención en el gen endógeno se criban por el procedimiento habitual. Después, las células ES cribadas se microinyectan en un huevo fertilizado obtenido de otro ratón normal (blastocito) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, No.12, pp.7380-7384 (1980); Patente de EE.UU. n° 4.873.191). El blastocito se trasplanta al útero de otro ratón normal como madre adoptiva. Después, nacen los ratones fundadores (ratones descendientes) del ratón madre adoptiva. Apareando ratones fundadores con ratones normales, se obtienen ratones transgénicos heterogénicos. Apareando los ratones transgénicos heterogénicos entre sí, se obtienen ratones transgénicos homogénicos de acuerdo con las leyes de Mendel.

El “ratón silenciado” es un ratón en el que se ha silenciado (inactivado) el gen endógeno que codifica el polipéptido derivado de ratón descrito en el presente documento (es decir, el “antígeno JTT-1 de ratón”). Se puede preparar, por ejemplo, por el procedimiento de selección positivo-negativo en el que se aplica la recombinación homóloga (patentes de EE.UU. n° 5.464.764; n° 5.487.992; n° 5.627.059; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 86, pp.8932-8935 (1989); *Nature*, Vol. 342, pp.435-438 (1989); etc.).

El “anticuerpo” de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal (antisuero) o un anticuerpo monoclonal, y preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

Específicamente, es un anticuerpo reactivo frente a (contra, que se une a) el polipéptido mencionado de la presente invención o fragmentos de polipéptido descritos en el presente documento.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos naturales obtenidos inmunizando mamíferos tales como ratas, cobayas y conejos con el antígeno, tal como células (células naturales, líneas celulares, células tumorales, etc.) que expresan “moléculas de superficie celular humanas” de la presente invención, transformantes que sobreexpresan el polipéptido o las moléculas de superficie celular humana de la presente invención en su superficie, preparadas usando tecnología de ADN recombinante en la superficie celular, o “fragmentos de polipéptidos” o “polipéptidos de fusión” descritos en el presente documento. El anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (anticuerpos injertados con CDR) que se pueden producir por tecnología de ADN recombinante, y anticuerpos humanos que se pueden producir usando animales transgénicos que producen anticuerpos humanos.

El anticuerpo monoclonal incluye los que tienen cualquier isotipo de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE. Se prefiere IgG o IgM.

El anticuerpo policlonal (antisuero) o anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede producir por procedimientos conocidos. Es decir, se inmuniza un mamífero, preferiblemente una rata, cobaya o conejo, por ejemplo con un antígeno mencionado antes con adyuvantes de Freund, si es necesario.

El anticuerpo policlonal se puede obtener del antisuero obtenido de los animales inmunizados de esta forma. Además, los anticuerpos monoclonales se producen como sigue. Se preparan hibridomas a partir de las células que producen anticuerpos obtenidas de animales inmunizados de esta forma, y células de mieloma que no son capaces de producir anticuerpos. Los hibridomas se clonan, y se criban los clones que producen los anticuerpos monoclonales que muestran afinidad específica para el antígeno usado para inmunizar el mamífero.

Específicamente, el anticuerpo monoclonal se puede producir como sigue. Las inmunizaciones se realizan inyectando o implantando una vez o varias veces el antígeno como se ha mencionado antes como un inmunógeno, si es necesario, con adyuvante de Freund, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, a través de la almohadilla de la pata o por vía intraperitoneal en un mamífero no humano, específicamente una rata, cobaya o conejo, preferiblemente una rata (incluido un animal transgénico generado para producir anticuerpos derivados de otro animal tal como el

ratón transgénico que produce el anticuerpo humano mencionado a continuación). Normalmente, se llevan a cabo las inmunizaciones de una a cuatro veces cada uno a catorce días después de la primera inmunización. Las células que producen anticuerpos se obtienen del mamífero inmunizado de esta forma aproximadamente de uno a cinco días después de la última inmunización. La frecuencia e intervalo de inmunizaciones se puede planear adecuadamente dependiendo de la propiedad del inmunógeno usado. Los hibridomas que segregan un anticuerpo monoclonal se pueden preparar por el procedimiento de Kohler y Milstein (*Nature*, Vol. 256, pp.495-497 (1975)) y por su procedimiento modificado. Es decir, los hibridomas se preparan fusionando células que producen anticuerpos contenidas en un bazo, nódulo linfático, médula ósea o amígdala obtenidos del mamífero no humano inmunizado como se ha mencionado antes, preferiblemente el bazo, con mielomas sin capacidad de producción de autoanticuerpos, que derivan de un mamífero tal como una rata, cobaya, conejo o ser humano, o más preferiblemente una rata o ser humano.

Por ejemplo, se puede usar el mieloma derivado de ratón P3/X63-AG8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/0-Ag14 (Sp2/0, Sp2), PAI, F0, o BW5147, mieloma derivado de rata 210RCY3-Ag.2.3., o mieloma derivado de ser humano U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 o CEM-T15, como un mieloma usado para la fusión celular.

Los clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales se pueden cribar cultivando los hibridomas, por ejemplo, en placas de microvaloración y midiendo la reactividad del líquido sobrenadante del cultivo en el pocillo en el que se observa crecimiento del hibridoma, frente al inmunógeno usado para la inmunización mencionada antes, por ejemplo, por inmunoensayo enzimático tal como RIA y ELISA.

Los anticuerpos monoclonales se pueden producir a partir de hibridomas cultivando los hibridomas *in vitro* o *in vivo* tal como en el líquido de ascitis de una rata, cobaya o conejo, preferiblemente una rata, y aislando los anticuerpos del líquido sobrenadante del cultivo resultante o el líquido de ascitis de un mamífero.

El cultivo de hibridomas *in vitro* se puede realizar dependiendo de la propiedad de las células que se van a cultivar, del objetivo del estudio de ensayo, y de las diferentes condiciones del procedimiento de cultivo, usando medio nutriente conocido o cualquier medio nutriente derivado de un medio basal para el crecimiento conocido, mantenimiento y almacenamiento de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales en el líquido sobrenadante del cultivo.

Son ejemplos de medios basales los medios con concentración baja de calcio tal como el medio F12 de Ham, medio MCDB153 o medio MEM con concentración baja de calcio, y medios con concentración alta de calcio tales como medio MCDB104, medio MEM, medio D-MEM, medio RPMI1640, medio ASF104 o medio RD. El medio basal puede contener, por ejemplo, suero, hormonas, citocinas y/o diferentes sustancias inorgánicas u orgánicas dependiendo del objetivo.

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir del líquido sobrenadante o el líquido de ascitis mencionado antes mediante precipitación con sulfato amónico saturado, el procedimiento de precipitación con euglobulina, procedimiento del ácido caproico, procedimiento del ácido caprílico, cromatografía de intercambio iónico (DEAE o DE52), cromatografía de afinidad usando columna de anti-inmunoglobulina o columna de proteína A.

Los ejemplos preferidos de anticuerpos monoclonales de la presente invención son los siguientes.

(1) Un anticuerpo específico para el polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo seleccionado del grupo constituido por anticuerpo de rata, anticuerpo de cobaya, anticuerpo de conejo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo humano.

(2) El anticuerpo de (1), en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una parte del anticuerpo monoclonal, en el que la parte se selecciona del grupo constituido por F(ab')₂, Fab' y Fab.

(3) Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de (1) o (2) o una parte del anticuerpo monoclonal como se define en (2) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además se describen en este documento los siguientes anticuerpos monoclonales.

(1) Un anticuerpo monoclonal reactivo frente a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, un fragmento de polipéptido derivado del polipéptido, o una molécula de superficie celular derivada de ser humano compuesta del polipéptido;

(2) Un anticuerpo monoclonal reactivo frente a un polipéptido de la presente invención, un fragmento de polipéptido derivado del polipéptido, o una molécula de superficie celular compuesta del polipéptido, en el que el efecto del anticuerpo monoclonal en las células linfoblasto estimuladas con mitógeno es sustancialmente el mismo que el efecto de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma identificado por un n° de acceso del depósito internacional FERM BP-5707 en las células linfoblasto de rata estimuladas con mitógeno; y

(3) Un anticuerpo monoclonal reactivo frente a un polipéptido de la presente invención, un fragmento de polipéptido derivado del polipéptido, o una molécula de superficie celular compuesta del polipéptido, en el que el efecto del anticuerpo monoclonal en las células linfoblasto estimuladas con mitógeno es sustancialmente el mismo que el efecto

de un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma identificado por un nº de acceso del depósito internacional FERM BP-5708 en las células linfoblasto de rata estimuladas con mitógeno.

Además, el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento incluye el producido por el hibridoma identificado por un nº de acceso del depósito internacional FERM BP-5707 o FERM BP-5708.

El "anticuerpo monoclonal quimérico" de la presente invención es un anticuerpo monoclonal preparado por ingeniería genética, y específicamente significa un anticuerpo quimérico tal como anticuerpo monoclonal de ratón/humano quimérico cuyas regiones variables derivan de inmunoglobulinas de un mamífero no humano (ratón, rata, hámster, etc.) y cuyas regiones constantes derivan de inmunoglobulina humana.

La región constante derivada de inmunoglobulina humana tiene la secuencia de aminoácidos inherente a cada isotipo tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. La región constante del anticuerpo monoclonal quimérico recombinante de la presente invención puede ser la de inmunoglobulina humana perteneciente a cualquier isotipo. Preferiblemente, es la región constante de la IgG humana.

El anticuerpo monoclonal quimérico de la presente invención se puede producir, por ejemplo, como sigue. No es necesario decir que el procedimiento de producción no está limitado a este.

Se puede preparar un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/humano, remitiendo a *Experimental Medicine: SUPPLEMENT*, Vol. 1.6, No. 10 (1988); y la solicitud de patente japonesa publicada (JP-B) Nº Hei 3-73280. Es decir, se puede preparar por inserción operativa del gen CH (gen C que codifica la región constante de la cadena H) obtenido del ADN que codifica la inmunoglobulina humana secuencia abajo de los genes VH activos (gen VDJ reordenado, que codifica la región variable de la cadena H) obtenido del ADN que codifica un anticuerpo monoclonal de ratón aislado del hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de ratón, y el gen CL (gen C que codifica la región constante de la cadena L) obtenido del ADN que codifica la inmunoglobulina humana secuencia abajo de los genes VL activos (gen VJ reordenado que codifica la región variable de la cadena L) obtenido del ADN que codifica el anticuerpo monoclonal de ratón aislado del hibridoma, en el mismo o diferentes vectores, para que sean expresados, seguido de transformación de las células hospedantes con el vector de expresión, y después cultivando los transformantes.

Específicamente, los ADN se extraen primero de los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de ratón por el procedimiento habitual, se hacen digerir con las enzimas de restricción adecuadas (por ejemplo, EcoRI y HindIII), se tratan por electroforesis (usando, por ejemplo, gel de agarosa al 0,7%), y se analizan por transferencia Southern. Después de tñir el gel en el que se ha hecho la electroforesis, por ejemplo, con bromuro de etidio, y fotografiar, se dan posiciones de marcaje al gel, se lava dos veces con agua y se sumerge en HCl 0,25 M durante 15 minutos. Después, el gel se sumerge en solución de NaOH 0,4 N durante 10 minutos, con agitación suave. Los ADN se transfieren a un filtro durante 4 horas por el procedimiento habitual. Se recupera el filtro y se lava dos veces con 2xSSC. Después de secar suficientemente el filtro, se mete en el horno a 75°C durante 3 horas. Después del horno, el filtro se trata con 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 65°C durante 30 minutos. Después, se sumerge en 3 x SSC/SDS al 0,1%. El filtro obtenido se trata con solución de prehibridación en una bolsa de plástico a 65°C durante 3 a 4 horas.

Después, se añaden la sonda de ADN marcada con ³²P y la solución de hibridación a la bolsa y se hace reaccionar a 65°C durante aproximadamente 12 horas. Después de la hibridación, el filtro se lava con la concentración de sal, temperatura de reacción y tiempo adecuados (por ejemplo, 2 x SSC-SDS al 0,1%, temperatura ambiente, 10 minutos). El filtro se pone en una bolsa de plástico con un poco de 2 x SSC, y se somete a autorradiografía después de cerrar la bolsa.

El gen VDJ reordenado y el gen VJ que codifican la cadena H y la cadena L de un anticuerpo monoclonal de ratón se identifican por transferencia Southern como se ha mencionado antes. La región que comprende el fragmento de ADN identificado se fracciona por centrifugación por gradiente de densidad con sacarosa y se inserta en un vector fago (por ejemplo, Charon 4A, Charon 28, λEMBL3, λEMBL4, etc.). *E. coli* (por ejemplo, LE392, NM539, etc.) se transforma con el vector fago para generar una biblioteca genómica. La biblioteca genómica se criba por hibridación en placa tal como por el procedimiento de Benton-Davis (*Science*, Vol. 196, pp.180-182 (1977)) usando las sondas adecuadas (gen J de la cadena H, gen J (κ) de la cadena L, etc.) para obtener clones positivos que comprenden el gen VDJ reordenado o el gen VJ. Haciendo el mapa de restricción y determinando la secuencia de nucleótidos de los clones obtenidos, se confirma que los genes comprenden el gen VH reordenado (VDJ) o gen VL (VJ) deseados.

Por separado, se aíslan el gen CH humano y el gen CL humano para la quimerización. Por ejemplo, cuando se produce un anticuerpo quimérico con IgG1 humana, se aíslan el gen Cγ1 como gen CH y el gen Cκ como gen CL. Estos genes se pueden aislar de la biblioteca genómica humana con el gen Cγ1 de ratón y el gen Cκ de ratón, correspondientes al gen Cγ1 humano y gen Cκ humano, respectivamente, como sondas, aprovechando la alta homología entre las secuencias de nucleótidos del gen de inmunoglobulina de ratón y el gen de inmunoglobulina humana.

Específicamente, se aíslan fragmentos de ADN, que comprenden el gen Cκ humano y una región potenciadora, de la biblioteca genómica de Charon 4A (HaeIII-AluI) λ humana (*Cell*, Vol. 15, pp. 1157-1174 (1978)), por ejemplo, con un fragmento HindIII-BamHI de 3 kb del clon Ig146 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 75, pp. 4709-4 713 (1978)) y un fragmento EcoRI de 6,8 kb del clon MEP10 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 78, pp.474-478 (1981)) como sondas. Además, por ejemplo, después de hacer digerir el ADN de hepatocito fetal humano con HindIII y de fraccionarlo por

electroforesis en gel de agarosa, se inserta un fragmento de 5,9 kb en λ 788 y después se aísla el gen C γ 1 humano con las sondas mencionadas antes.

Usando el gen VH de ratón, gen VL de ratón, gen CH humano y gen CL humano obtenidos de esta forma, y teniendo en cuenta la región promotora y región potenciadora, el gen CH humano se inserta secuencia abajo del gen VH de ratón y el gen CL humano se inserta secuencia abajo del gen VL de ratón en un vector de expresión tal como pSV2gpt o pSV2neo con las enzimas de restricción adecuadas y ADN ligasa por el procedimiento habitual. En este caso, se puede insertar respectivamente genes quiméricos de gen VH de ratón/gen CH humano y de gen VL de ratón/gen CL humano en el mismo vector de expresión o en vectores de expresión diferentes.

El vector o vectores de expresión con gen quimérico insertado preparados de esta forma se introducen en mielomas que no producen anticuerpos, por ejemplo, células p3X63.Ag8.653 o células SP210 por el procedimiento de fusión de protoplastos, procedimiento de DEAE-dextrano, procedimiento de fosfato cálcico o procedimiento de electroporación. Los transformantes se seleccionan cultivándolos en medios que contienen un fármaco que corresponde al gen de resistencia al fármaco insertado en el vector de expresión, y después se obtienen las células que producen los anticuerpos monoclonales quiméricos deseados.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos deseados se obtienen del líquido sobrenadante del cultivo de las células cribadas que producen anticuerpos.

El “anticuerpo monoclonal humanizado (anticuerpo injertado con CDR)” de la presente invención es un anticuerpo monoclonal preparado por ingeniería genética y significa específicamente un anticuerpo monoclonal humanizado en el que una parte o todas las regiones determinantes de complementaridad de la región hipervariable derivan de las regiones determinantes de complementaridad de la región hipervariable de un anticuerpo monoclonal de un mamífero no humano (ratón, rata, hámster, etc.), las regiones marco de la región variable se obtienen de las regiones marco de la región variable de la inmunoglobulina humana, y la región constante deriva de la región constante humana de la inmunoglobulina.

Las regiones determinantes de la complementaridad de la región hipervariable existen en la región hipervariable en la región variable de un anticuerpo y significa tres regiones que se unen directa y complementariamente a un antígeno (restos determinantes de complementaridad, CDR1, CDR2 y CDR3). Las regiones marco de la región variable significa cuatro regiones comparativamente conservadas que están secuencia arriba, secuencia abajo o entre las tres regiones determinantes de complementaridad (región marco, FR1, FR2, FR3 y FR4).

En otras palabras, un anticuerpo monoclonal humanizado es aquel en el que la región entera excepto una parte o todas las regiones determinantes de complementaridad de la región hipervariable de un anticuerpo monoclonal derivado de mamífero no humano, se han sustituido por sus correspondientes regiones derivadas de inmunoglobulina humana.

La región constante derivada de inmunoglobulina humana tiene la secuencia de aminoácidos inherente a cada isotipo, tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. La región constante de un anticuerpo monoclonal humanizado en la presente invención puede ser la de la inmunoglobulina humana perteneciente a cualquier isotipo. Preferiblemente, es la región constante de la IgG humana. Las regiones marco de la región constante derivada de inmunoglobulina humana no están particularmente limitadas.

El anticuerpo monoclonal humanizado de la presente invención se puede producir, por ejemplo, como sigue. No es necesario decir, que el procedimiento de producción no está limitado a este.

Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante derivado de anticuerpo monoclonal de ratón por ingeniería genética, por referencia a la publicación de patente japonesa sin examinar (JP-WA) n° Hei 4-506458 y la publicación de patente japonesa sin examinar (JP-A) n° Sho 62-296890. Es decir, se aíslan de los genes de inmunoglobulina humana al menos un gen de CDR de la cadena H de ratón y al menos un gen de CDR de la cadena L de ratón correspondientes al gen CDR de la cadena H de ratón de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de ratón, y el gen de la cadena H humana que codifica todas las regiones excepto la CDR de la cadena H humana correspondiente a la CDR de la cadena H de ratón mencionada antes y el gen de la cadena L humana que codifica la región entera excepto la CDR de la región L humana que corresponde a la CDR de la cadena L de ratón mencionada antes.

El gen o genes de CDR de la cadena H de ratón y el gen o genes de la cadena H humana aislados de esta forma se insertan de manera operativa en un vector adecuado de modo que puedan ser expresados. Igualmente, el gen o genes de CDR de la cadena L de ratón y el gen o genes de la cadena L humana se insertan de manera operativa en otro vector adecuado de modo que puedan ser expresados. Alternativamente, el gen o genes de CDR de la cadena H de ratón/gen o genes de la cadena H humana y el gen o genes de CDR de la cadena L de ratón/gen o genes de la cadena L humana, se pueden insertar de forma operativa en el mismo vector de expresión para que puedan ser expresados. Las células hospedantes se transforman con el vector de expresión preparado de esta forma para obtener transformantes que producen anticuerpo monoclonal humanizado. Cultivando los transformantes, se obtiene el anticuerpo monoclonal humanizado deseado del líquido sobrenadante del cultivo.

El "anticuerpo monoclonal humano" de la presente invención es la inmunoglobulina en la que las regiones enteras que comprenden la región constante y variable de la cadena H, y la región constante y variable de la cadena L que constituyen la inmunoglobulina, derivan del gen que codifica la inmunoglobulina humana.

5 El anticuerpo humano se puede producir de la misma forma que el procedimiento de producción de los anticuerpos policlonales o monoclonales mencionados antes, inmunizando con un antígeno un animal transgénico, en el que, por ejemplo, se han integrado al menos gen o genes de inmunoglobulina humana en el locus de un mamífero no humano tal como un ratón por el procedimiento habitual.

10 Por ejemplo, se prepara un ratón transgénico que produce anticuerpos humanos por los procedimientos descritos en *Nature Genetics*, Vol. 7, 10 pp.13-21 (1994); *Nature Genetics*, Vol. 15, pp.146-156 (1997); documentos JP-WA N° Hei 4-504365 y Hei 7-509137; *Nikkei Science*, No. 6, pp.40-50 (1995); publicación internacional de patente n° WO94/25585; *Nature*, Vol. 368, pp.856-859 (1994); y documento JP-WA n° Hei 6-500233.

15 Además, también se puede aplicar la técnica recientemente desarrollada para producir una proteína derivada de ser humano en la leche de una vaca o cerdo transgénicos (*Nikkei Science*, pp.78-84 (Abril, 1997)).

La "parte de un anticuerpo" usada en la presente invención significa una región parcial del anticuerpo monoclonal mencionado antes, y específicamente significa F(ab')₂, Fab' o Fab (*Exp. Opin. Ther. Patents*, Vol. 6, No.5, pp.441-456 (1996)).

"F(ab')₂" y "Fab'" se pueden producir tratando la inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) con una proteasa tal como pepsina y papaína, y significa un fragmento de anticuerpo generado haciendo digerir la inmunoglobulina cerca de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H. Por ejemplo, la papaína escinde la IgG secuencia arriba de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H para generar dos fragmentos homólogos de anticuerpo en los que una cadena L compuesta de VL (región variable de la cadena L) y CL (región constante de la cadena L) y una fragmento de cadena H compuestos de VH (región variable de la cadena H) y CH₁ (región γ 1 en la región constante de la cadena H) están conectadas en sus regiones C terminales por un enlace disulfuro. Cada uno de dichos dos fragmentos de anticuerpos homólogos se llama Fab'. La pepsina también escinde la IgG secuencia abajo de los enlaces disulfuro que existen entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H para generar un fragmento de anticuerpo ligeramente más largo que el fragmento en el que los dos Fab' mencionados están conectados en la región bisagra. Este fragmento de anticuerpo se llama F(ab')₂.

La "composición farmacéutica" de la presente invención comprende el "anticuerpo" o "parte de un anticuerpo" y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye un excipiente, un diluyente, un extensor, un agente de descomposición, un estabilizante, un conservante, un tampón, un emulsionante, un aroma, un colorante, un edulcorante, un agente de aumento de la viscosidad, un agente de sabor, un agente de aumento de la solubilidad u otros aditivos. Usando uno o más de dichos vehículos, se puede formular una composición farmacéutica en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, inyecciones, soluciones, cápsulas, trociscos, elixires, suspensiones, emulsiones o jarabes. La composición farmacéutica se puede administrar por vía oral o parenteral. Otras formas de administración parenteral incluyen una solución para aplicación externa, supositorio para administración rectal y pesario, formulados por el procedimiento habitual, que comprende uno o más principios activos.

La dosificación puede variar dependiendo de la edad, sexo, peso y síntomas de un paciente, efecto del tratamiento, vía de administración, periodo de tratamiento, o el tipo de principio activo (polipéptido o anticuerpo mencionado antes) que contiene la composición farmacéutica. Normalmente, la composición farmacéutica se puede administrar a un adulto con una dosis de 10 μ g a 1000 mg (o 10 μ g a 500 mg) por administración. Dependiendo de las diferentes condiciones, en algunos casos puede ser suficiente una dosificación menor que la mencionada antes, y en otros casos puede ser necesaria una dosificación mayor que la mencionada antes.

En particular, la inyección se puede producir disolviendo o suspendiendo el anticuerpo en un vehículo no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o agua destilada para inyección disponible en el comercio ajustando la concentración de 0,1 μ g de anticuerpo/ml de vehículo a 10 mg de anticuerpo/ml de vehículo. La inyección así producida se puede administrar a un paciente humano que necesite tratamiento con una dosis de 1 μ g a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 50 μ g a 50 mg/kg de peso corporal una o más veces al día. Los ejemplos de vía de administración son vías de administración médicamente adecuadas tales como inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intramuscular o inyección intraperitoneal, preferiblemente inyección intravenosa.

La inyección también se puede preparar en un diluyente no acuoso (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva y alcohol tal como etanol), suspensión o emulsión.

La inyección se puede esterilizar por filtración con un filtro por el que no penetran las bacterias, mezclando bactericida o por irradiación. La inyección se puede producir de forma que se prepare cuando se use. Es decir, se liofiliza para que sea una composición sólida estéril, y se puede disolver en agua destilada estéril para inyección u otro disolvente antes de usar.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede aplicar para tratar o prevenir diferentes enfermedades inflamatorias producidas por la activación de linfocitos tales como células T y la regulación de las funciones de los linfocitos activados. Son ejemplos de las enfermedades la dermatosis inflamatoria crónica tal como el liquen plano.

5 El efecto terapéutico de la composición farmacéutica de la presente invención para los síntomas de las diferentes enfermedades se puede ensayar por el procedimiento habitual, administrándola a un modelo animal de enfermedad conocido.

10 Los ejemplos del modelo incluyen (1) un ratón (NZN/NZW)F1, un modelo para lupus eritematoso sistémico humano (LES) (*Science*, Vol. 125, p.1225-1227 (1994)), (2) encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple (EM) (*J. Clin. Invest.*, Vol. 95, pp.27 83-2789 (1995)), (3) un ratón DNO (diabético no obeso), un modelo para la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) (*J. Exp. Med.*, Vol. 181, pp.1145-1155 (1995)), (4) modelo de nefritis de rata por inmunidad de la membrana basal del glomérulo renal, modelo de nefritis de Goodpasture (*Eur. J. Immunol.*, Vol. 24, No.6, pp.1249-1254 (1994)), y (5) un ratón DBA/1, un modelo para artritis reumatoide humana (*Eur. J. Immunol.*, Vol. 26, pp.2320-2328 (1996)).

Breve descripción de los dibujos

20 la fig. 1 son micrografías que muestran el estado de agregación de células FTL435 inducido por el “anticuerpo JTT-1” y el estado de inhibición de la agregación celular por el “anticuerpo JTT-2”.

la subfigura (a) muestra el estado de las células en ausencia de líquido sobrenadante con cualquier hibridoma, la subfigura (b) muestra el estado de agregación celular inducido por el “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (c) muestra el estado de agregación celular en presencia del “anticuerpo anti-ICAM-1” junto con el “anticuerpo JTT-1”, y la subfigura (d) muestra el estado de agregación celular en presencia del “anticuerpo JTT-2” junto con el “anticuerpo JTT-1”.

la fig. 2 son micrografías que muestran el estado de agregación de células FTL435 y linfoblastos activados de rata inducido por el “anticuerpo JTT-1” y el estado de inhibición de la agregación celular por el “anticuerpo JTT-2”.

30 la subfigura (a) muestra el estado de las células FTL435 en ausencia de cualquier anticuerpo, la subfigura (b) muestra el estado de las células FTL435 en presencia de PMA, la subfigura (c) muestra el estado de las células FTL435 en presencia del “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (d) muestra el estado de las células FTL435 en presencia del anticuerpo anti-LFA-1 junto con el “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (e) muestra el estado de las células FTL435 en presencia de anticuerpo anti-CD18 junto con el “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (f) muestra el estado de las células FTL435 en presencia de anticuerpo anti-ICAM-1 junto con el “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (g) muestra el estado de linfoblastos activados en ausencia de cualquier anticuerpo, la subfigura (h) muestra el estado de linfoblastos activados en presencia de PMA, la subfigura (i) muestra el estado de linfoblastos activados en presencia del “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (j) muestra el estado de linfoblastos activados en presencia del anticuerpo anti-LFA-1 junto con el “anticuerpo JTT-1”, la subfigura (k) muestra el estado de linfoblastos activados en presencia del anticuerpo anti-CD18 junto con el “anticuerpo JTT-1”, y la subfigura (l) muestra el estado de linfoblastos activados en presencia del anticuerpo anti-ICAM-1 junto con el “anticuerpo JTT-1”.

45 la fig. 3 muestra el estado de expresión del “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” en diferentes células medido con un citómetro de flujo.

la fig. 4 muestra el estado de expresión del “antígeno JTT-1” en diferentes células linfocíticas, medido con un citómetro de flujo.

50 la fig. 5 es una fotografía que muestra el electroforetograma del “antígeno JTT-1” analizado por SDS-PAGE.

la fig. 6 son micrografías que muestran el estado de adhesión de timocitos de rata a la placa de microvaloración recubierta con “antígeno JTT-1” purificado, donde la adhesión es inducida en presencia de “anticuerpo JTT-1”, y el estado de inhibición de la adhesión celular por el “anticuerpo JTT-2”.

55 la subfigura (a) muestra el estado de adhesión de las células a la placa que no se ha recubierto con el “antígeno JTT-1”, la subfigura (b) muestra el estado de adhesión de las células a la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” en ausencia de cualquier anticuerpo, la subfigura (c) muestra el estado de adhesión de las células a la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” en presencia de los fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1”, y la subfigura (d) muestra el estado de adhesión de las células a la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” en presencia del “anticuerpo JTT-2” junto con los fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1”.

la fig. 7 muestra el número relativo de células de timocitos que se adhieren a la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” purificado medido en términos de intensidad de fluorescencia.

65 “Ag(-)” muestra el número relativo de células en la placa que no se ha recubierto con el “antígeno JTT-1”, “Ag(+)” muestra el número relativo de células en la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” en ausencia de cualquier anticuerpo, “Ag(+) + JTT-1 Fab” muestra el número relativo de células en la placa recubierta con el “antígeno JTT-1” en presencia de los fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1”, y “Ag(+) + JTT-1 Fab + JTT-2” muestra el número relativo

de células en la placa recubierta con el "antígeno JTT-1" en presencia del "anticuerpo JTT-2" junto con los fragmentos Fab del "anticuerpo JTT-1".

la fig. 8 muestra el estado de expresión del "antígeno JTT-1 de rata" y el "antígeno JTT-2 de rata" en células COS transformadas con el ADNc que codifica el "antígeno JTT-1 de rata", con un citómetro de flujo.

la fig. 9 muestra las características estructurales de la secuencia de aminoácidos del "antígeno JTT-1" puesta de manifiesto por análisis gráfico de hidropatía.

la fig. 10 muestra la homología entre las secuencias de aminoácidos de "antígeno JTT-1" de ser humano, rata y ratón y "antígeno JTT-1 de rata" mutante.

la fig. 11 muestra la homología entre las secuencias de aminoácidos y el estado de conservación de los motivos en el "antígeno JTT-1 humano", "molécula CD28 humana" y "molécula CTLA-4 humana".

la fig. 12 muestra de forma esquemática la estructura secundaria de la proteína y la similitud entre el "antígeno JTT-1 humano", "molécula CD28 humana" y "molécula CTLA-4 humana".

la fig. 13 muestra esquemáticamente la estructura del ADN genómico que codifica el "antígeno JTT-1 de ratón".

la fig. 14 muestra la diferencia de las secuencias de aminoácidos entre el "antígeno JTT-1 de rata" y su alternativa el mutante de religación.

la fig. 15 muestra el grado de crecimiento de los linfocitos de la sangre periférica humana inducido por el anticuerpo monoclonal contra el "antígeno JTT-1 humano", donde el grado de crecimiento se midió por absorción de [3H]-timidina. El eje de ordenadas muestra la cantidad de absorción (dpm) de [3H]-timidina en las células.

la fig. 16 muestra el efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal contra el "antígeno JTT-1" en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en un modelo de enfermedad en rata. El eje de ordenadas muestra la clasificación de los síntomas de la enfermedad y el eje de abscisas muestra los días después de inmunización para la inducción de la EAE.

la fig. 17 muestra el efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal contra el "antígeno JTT-1" en la glomerulonefritis en un modelo de enfermedad en rata. El eje de ordenadas muestra la cantidad de excreción urinaria de proteínas, y el eje de abscisas muestra el transcurso de tiempo (semanas) después de la inmunización para la inducción de la glomerulonefritis.

la fig. 18 muestra un histograma de columnas en la purificación del polipéptido de fusión entre la región extracelular del "antígeno JTT-1 de rata" y la IgFc humana (rJTT-1-IgFc) con la columna de proteína A-sefarosa.

la fig. 19 es una fotografía que muestra el electroforetograma de rJTT-1-IgFc analizado por SDS-PAGE.

la fig. 20 muestra un histograma de columnas en la purificación del polipéptido de fusión entre la región extracelular del "antígeno JTT-1 humano" y la IgFc humana (hJTT-1-IgFc) con la columna de proteína A-sefarosa.

la fig. 21 es una fotografía que muestra el electroforetograma de hJTT-1-IgFc analizado por SDS-PAGE.

la fig. 22 muestra esquemáticamente la estructura del vector de transferencia de genes (dirigido) usado para preparar un ratón transgénico en el que se ha introducido el ADNc que codifica el "antígeno JTT-1 de rata".

Mejor modo de implementar la invención

La presente invención se describe con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, pero no se debe considerar que está limitada por estos.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales

Se prepararon hibridomas que producen anticuerpos de acuerdo con el procedimiento de Kohler y col. (Omori y col., *Blood*, Vol. 81, pp.101-111 (1993)), y se prepararon anticuerpos monoclonales de acuerdo con el procedimiento de Kannagi y col. (*Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 4, 117.21-117.21 (1986)).

Primero, se administraron células FTL435 de la línea celular de timoma de rata como antígeno de inmunización a ratones BALB/c en las almohadillas de las patas en una cantidad de 10^7 células/ratón a intervalos de 0, 7, 14 y 28 días. La mezcla del antígeno con adyuvante completo de Freund se administró solo en la primera inmunización. Dos días después de la última inmunización, se cogieron los nódulos linfáticos de los ratones y se fusionaron con células PAI de mieloma de ratón (JCRNo. B0113; Stocker, J. W. y col., 35 *Res. Disclosure*, Vol. 217, p.155 (1982)) por el procedimiento habitual para obtener muchos hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 2

Cribado de hibridomas y caracterización de anticuerpos monoclonales

5 Se cribaron los hibridomas preparados en el Ejemplo 1 analizando el efecto de los anticuerpos producido en el líquido sobrenadante del cultivo de los hibridomas en las células FTL435, que se usaron como inmunógeno. Se sembraron células FTL435 (5×10^6 células/ml, 0,1 ml) en cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos y se cultivaron a 37°C durante 1 hora en presencia del líquido sobrenadante del cultivo de cada hibridoma (10 µg/ml cada uno). Los resultados obtenidos para los clones de hibridoma “JTT-1” y “JTT-2” se muestran en la figura 1 y
10 figura 2.

Se puso de manifiesto que un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma “JTT-1” (“anticuerpo JTT-1”) aglutinaba fuertemente células FTL435 (figura 1 (b) y figura 2 (c)) y que la adición del “anticuerpo JTT-2” inhibía fuertemente la agregación de las células FTL435 inducida por la estimulación con el “anticuerpo JTT-1” (figura 1 (d)). Los ensayos en los que no se añadió líquido sobrenadante de hibridoma, se usaron como controles (figura 1 (a) y figura 2 (a)).
15

Con el fin de determinar si la agregación de las células FTL435 inducida por la estimulación con “anticuerpo JTT-1” era producida por la adhesión celular entre la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y el antígeno asociado a función de linfocito 1 (LFA-1), que es una ruta representativa conocida de la adhesión celular, las células FTL435 se cultivaron a 37°C durante 1 hora en presencia de anticuerpo anti-ICAM-1 de rata 1A29 (10 µg/ml; IgG1) o anticuerpo anti-LFA-1 de rata (10 µg/ml; IgG2a) junto con el “anticuerpo JTT-1”.
20

La agregación de las células FTL435 por la estimulación con “anticuerpo JTT-1” no era inhibida ni por el anticuerpo anti-ICAM-1 ni por el anticuerpo anti-LFA-1 (anticuerpo anti-ICAM-1, figura 1 (c) y figura 2 (f); anticuerpo anti-LFA-1, figura 2 (d)).
25

Con el fin de analizar más la capacidad de aglutinación celular del “anticuerpo JTT-1”, se analizó la capacidad de aglutinar células linfoblasto de rata activadas por estimulación con concanavalina A, de la misma forma mencionada antes. Los resultados se muestran en la figura 2.
30

De la misma forma que el efecto en las células FTL435, se indujo la agregación de células linfoblasto activadas por estimulación con “anticuerpo JTT-1” (figura 2 (i)). La agregación de células linfoblasto activadas por estimulación con “anticuerpo JTT-1” era inhibida en su mayor parte por el anticuerpo anti-LFA-1 (figura 2 (j)) y el anticuerpo anti-ICAM-1 (figura 2 (l)). (Sin embargo, se produjo agregación parcial).
35

Como se entiende por el ensayo del control (figura 2 (g)), en el que no se añadió anticuerpo, los linfocitos activados tales como los linfoblastos activados no mostraron agregación por adhesión celular salvo que recibieran la estimulación con miristato-acetato de forbol (PMA, que activa los LFA-1) (figura 2 (h)) o con “anticuerpo JTT-1” (figura 2 (i)). Por lo tanto, el hecho de que el anticuerpo anti-LFA-1 inhiba parcialmente la agregación celular por la estimulación con “anticuerpo JTT-1”, indica que los LFA-1 en las células linfoblastos activadas eran activados por la estimulación con el “anticuerpo JTT-1”. Esto también indica que las moléculas reconocidas por el “anticuerpo JTT-1” están implicadas en alguna transmisión de señal.
40

Los clones de hibridoma “JTT-1” y “JTT-2” se han depositado según el Tratado de Budapest con la autoridad de depósito internacional, Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Ministerio de Comercio Internacional e Industria, Japón (1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) desde el 11 de Octubre de 1996, con nº de acceso internacional FERM BP-5707 y FERM BP-5708, respectivamente.
45

El análisis usando el kit de identificación de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón (Amersham) determinó que el isotipo de los anticuerpos monoclonales producidos de cada hibridoma (anticuerpo JTT-1 y anticuerpo JTT-2) eran ambos IgG1.
50

Ejemplo 3

Reactividad del “anticuerpo JTT-1” y el “anticuerpo JTT-2” para diferentes células

Con el fin de analizar el patrón de expresión de moléculas reconocidas por el “anticuerpo JTT-1” y el “anticuerpo JTT-2” en diferentes células, se examinaron las reactividades de los anticuerpos frente a diferentes células. Las moléculas reconocidas por el “anticuerpo JTT-1” o el “anticuerpo JTT-2” se denominan “antígeno JTT-1” o “antígeno JTT-2”, respectivamente.
60

Se sacrificó una rata wistar de cinco a diez semanas de edad (150 a 250 g) por anestesia con éter dietílico. Se sacaron el timo y el bazo de su pecho y abdomen, respectivamente, por celiotomía, y se homogeneizaron para preparar la suspensión celular. Las células de bazo resultantes se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía concanavalina A 2 µg/ml y FCS al 10%, a 37°C durante 3 días para preparar linfoblastos activados.
65

Las células FTL435, timocitos, células del bazo y linfoblastos activados (5×10^6 células de cada) se hicieron reaccionar con “anticuerpo JTT-1” o “anticuerpo JTT-2” y después con IgG anti-ratón marcada con FITC (Cappel). La intensidad de la fluorescencia de las células teñidas se midió con citómetro de flujo EPICS-Elite.

Los resultados se muestran en la figura 3. En las células FTL435, se observó expresión fuerte del “antígeno JTT-1” y del “antígeno JTT-2”. Aunque los antígenos se expresaban en los timocitos, se expresaban sólo un poco en las células de bazo. Sin embargo, en los linfoblastos activados obtenidos estimulando células del bazo con concanavalina A, el “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” se expresaban fuertemente. Además, en cada tipo de célula el patrón de expresión del “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” coincidían entre sí. Estos resultados indican que el “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” son las mismas moléculas.

Ejemplo 4

Reactividad del “anticuerpo JTT-1” frente a diferentes células linfocíticas

Con el fin de analizar el patrón de expresión de moléculas (“antígeno JTT-1”) reconocidas por el “anticuerpo JTT-1” en diferentes células linfocíticas, se analizó la reactividad del “anticuerpo JTT-1” frente a nódulos linfáticos, linfoblastos T derivados del bazo y linfoblastos B derivados del bazo de dos tipos de ratas (rata Wistar y rata F344).

Se sacrificaron una rata Wistar y una rata F344 de cinco a diez semanas de edad (150 a 250 g) por anestesia con éter dietílico. Se sacaron los nódulos linfáticos y el bazo de cada rata, por celiotomía, y se homogeneizaron para preparar la suspensión celular. La suspensión celular resultante del bazo se cultivó en medio RPMI1640 que contenía concanavalina A (ConA) $2 \mu\text{g/ml}$ y FCS al 10%, a 37°C durante 3 días. Se obtuvieron los linfoblastos T activados y linfoblastos B activados de cada rata después de 1 día y 3 días de cultivo. Además, se usaron como control linfoblastos T y linfoblastos B derivados del bazo obtenidos antes de añadir las células del nódulo linfático y la ConA.

Cada grupo de células (5×10^5 células cada uno) se hizo reaccionar con anticuerpo anti-célula T de rata marcado con biotina o anticuerpo anti-célula B de rata marcado con biotina ($10 \mu\text{g/ml}$, Seikagaku Corporation), y posteriormente con estreptavidina marcada con ficocitrina. Después las células se hicieron reaccionar con “anticuerpo JTT-1” marcado con FITC $10 \mu\text{g/ml}$. Se midió la intensidad de la fluorescencia de las células teñidas con citómetro de flujo EPICS-Elite.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Tanto en los linfoblastos T activados como en los linfoblastos B activados de la rata Wistar y la rata F344, se observó expresión fuerte del “antígeno JTT-1” desde el día 1 de activación con estimulación con ConA. Además, coincidían entre sí los patrones de expresión del “antígeno JTT-1” en cada clase de células casi perfectamente.

Ejemplo 5

Caracterización del “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” por inmunoprecipitación

El “antígeno JTT-1” y “antígeno JTT-2” se caracterizaron por inmunoprecipitación usando células FTL435.

(1) Preparación de moléculas de superficie celular solubles biotiniladas

Se lavaron células FTL435 con PBS, se suspendieron en solución salina fisiológica que contenía NHS-biotina $100 \mu\text{g/ml}$ y HEPES $0,1 \text{ M}$ (pH 8,0) para ajustar a 1×10^7 células/ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 40 minutos. Las células se lavaron tres veces con PBS, se les añadió tampón de lisis (NP-40 al 1%, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl $0,15 \text{ M}$) para ajustar a 5×10^7 células/ml, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante 30 minutos para lisar las células. El lisado de células obtenido se centrifugó, y el líquido sobrenadante que comprendía moléculas de superficie celular solubles biotiniladas se almacenó a -80°C .

(2) Inmunoprecipitación y análisis con SDS-PAGE

La muestra purificada del “anticuerpo JTT-1” purificada por el procedimiento habitual a partir del líquido sobrenadante de cultivo del clon de hibridoma “JTT-1” preparado en el Ejemplo 1, se mezcló con perlas de proteína G-sefarosa para ajustar a 2 mg/ml , y se dejó reaccionar a 4°C durante 1 hora para que se uniera el anticuerpo a las perlas. Después, se lavaron las perlas, se añadieron $500 \mu\text{l}$ de lisado de células FTL435 biotiniladas a $10 \mu\text{l}$ de las perlas, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante 2 horas. Después las perlas se lavaron con tampón de lisis tres veces, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de tampón de glicanasa (tampón de fosfato sódico (pH 7,0) que contenía SDS al 0,15%) a las perlas y la mezcla se hirvió para eluir las moléculas unidas atrapadas por las perlas unidas a anticuerpo. Se añadieron NP-40 al 1,25% y N-glicanasa 20 U/ml a una fracción de la muestra eluida, y la mezcla se dejó reaccionar toda la noche para digerir las cadenas de azúcar unidas a N.

Se añadió un volumen igual de tampón de muestra (Enprotech) para el SDS-PAGE a $5 \mu\text{l}$ de la muestra eluida en presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol, y la mezcla se hirvió. Después de electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con BSA-PBS al 3% y se hizo reaccionar con estreptavidina marcada

con peroxidasa para detectar las moléculas de superficie celular solubles biotiniladas atrapadas por el “anticuerpo JTT-1” con el sistema ECL (Amersham) como se describe en el manual.

Los resultados se muestran en la figura 5. La molécula reconocida por el “anticuerpo JTT-1” (“antígeno JTT-1”) en las células FTL435 mostró un peso molecular de aproximadamente 47 kD en las condiciones no reducidas (“(-)” en la figura 5) y aproximadamente 24 kD y 28 kD en condiciones reducidas (“(+)” en la figura 5). Como resultado de la digestión de las cadenas de azúcar unidas por N (“+N-gly” en la figura 5), el “antígeno JTT-1” convergía en una sola banda de aproximadamente 36 kD en condiciones no reducidas y aproximadamente 20 kD en condiciones reducidas. Estos resultados sugieren que el “antígeno JTT-1” forma un dímero en el que las mismas proteínas centrales tienen diferentes cadenas de azúcar. Se obtuvieron los mismos resultados en los experimentos realizados como se ha mencionado antes usando el “anticuerpo JTT-2”. Considerando estos resultados junto con los resultados del Ejemplo 3 y el siguiente Ejemplo 7, se ha pensado que el “antígeno JTT-1” (molécula reconocida por el “anticuerpo JTT-1”) y el “antígeno JTT-2” (molécula reconocida por el “anticuerpo JTT-2”) son idénticos entre sí.

Ejemplo 6

Experimento de adhesión de timocitos de rata al “antígeno JTT-1” purificado y análisis de los aminoácidos N-terminales

Los siguientes experimentos se realizaron para analizar si la molécula que reconoce el “anticuerpo JTT-1” (“antígeno JTT-1”) funciona como una molécula de adhesión. También se llevó a cabo el análisis de los aminoácidos N-terminales.

(1) Preparación de la columna de afinidad del “anticuerpo JTT-1”

La muestra purificada (2 mg en 2 ml) de “anticuerpo JTT-1” purificado por el procedimiento habitual a partir del líquido sobrenadante de cultivo del clon de hibridoma de “JTT-1” preparado en el Ejemplo 1, se mezcló con 1 ml de resina de proteína G-sefariosa, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante 1 hora. La resina se lavó tres veces con trietanolamina 20 mM (pH 8,2). Después la resina se incubó en trietanolamina (pH 8,2) que contenía pimelimidato de dimetilo (DMP) 10 mM a temperatura ambiente durante 1 hora para la unión covalente del “anticuerpo JTT-1” a la resina.

(2) Purificación del “antígeno JTT-1”

Las células FTL435 se cultivaron en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10%. Las células se recogieron por centrifugación para obtener un sedimento y se lavaron con PBS tres veces. Se añadió tampón de lisis (NP-40 al 1%, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M) al sedimento lavado para ajustar a 5×10^7 células/ml, y la mezcla se dejó reaccionar a 4°C durante 30 minutos para lisar las células. El lisado de células obtenido se centrifugó y el líquido sobrenadante que contenía moléculas de superficie celular solubles se almacenó a -80°C.

El lisado (400 ml) se cargó en la columna de afinidad del “anticuerpo JTT-1”. Después de lavar la columna con 50 ml de tampón de lisis y 20 ml de PBS, se eluyó el “antígeno JTT-1” con tampón de glicina 0,2 M (pH 2,8). Se añadió tampón de Tris 1 M al “antígeno JTT-1” eluido para la neutralización. El “antígeno JTT-1” obtenido se almacenó a -80°C.

(3) Determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal

Después de someter el “antígeno JTT-1” purificado a SDS-PAGE, se determinó la secuencia de aminoácidos N-terminales por el procedimiento habitual. El resultado puso de manifiesto que el “antígeno JTT-1” contenía una secuencia de aminoácidos Glu-Leu-Asn-Asp-Leu-Ala-Asn-His-Arg.

(4) Experimento de adhesión

Se sacrificó una rata Wistar de cinco a diez semanas de edad (150 a 250 g) por anestesia con éter dietílico. Se sacó el timo de su pecho por celiotomía y se homogeneizó para preparar la suspensión de timocitos. Se añadió éster de tetraacetoximetilo de la 2',7'-bis(carboxietil)carboxifluoresceína 10 μ M (BCECF-AM; Molecular Probes) a la suspensión, y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos para marcar los timocitos por fluorescencia. Las células se lavaron con PBS y se suspendieron en medio RPMI1640 que contenía FCS al 10% para ajustar a 2×10^7 células/ml.

Con el “antígeno JTT-1” purificado obtenido en (2) se recubrió una placa ELISA de 96 pocillos con una concentración 10 μ l/pocillo toda la noche. Después de lavar la placa con PBS, se añadieron a la placa 200 μ l/pocillo de PBS que contenía BSA al 3%, y se llevó a cabo el bloqueo durante 2 horas. Después de lavar la placa con PBS, se añadió a cada pocillo (1) solo timocitos con marcador fluorescente (2×10^7 células/ml, 0,1 ml), (2) timocitos con marcador fluorescente (la misma concentración) y fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1” preparados por el procedimiento habitual (5 μ g/ml), o (3) timocitos con marcador fluorescente (la misma concentración), los fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1” (la misma concentración) y “anticuerpo JTT-2” (10 μ g/ml), y se cultivaron a 37°C durante 1 hora. Para separar las células no unidas, cada pocillo se lavó una vez con medio RPMI1640 que contenía FCS al 10%. Cada pocillo se observó con microscopio óptico. Después se añadieron 100 μ l de NP-40 al 0,1% a cada pocillo, y las células adheridas

a la placa se lisaron. Se contó el número relativo de células de timocitos con marcador fluorescente adheridos a cada pocillo midiendo la intensidad de la fluorescencia a 538 nm (excitación a 485 nm) con el fluorómetro Fluoroscanner II Microplate (Flow Laboratories). Se usó como control el ensayo en el que una placa no se había recubierto con “antígeno JTT-1” purificado.

Los resultados de la observación con el microscopio óptico se muestran en la Figura 6.

Los timocitos se adhirieron significativamente al “antígeno JTT-1” purificado sólo en presencia de fragmentos Fab del “anticuerpo JTT-1” (figura 6 (c)). La adhesión se inhibía significativamente con el “anticuerpo JTT-2” (figura 6 (d)).

La figura 7 muestra el número relativo de células de timocitos adheridas al “antígeno JTT-1” que recubría cada pocillo, en términos de intensidad de fluorescencia.

A partir de estos resultados, se puso de manifiesto que el “antígeno JTT-1” funciona como una molécula de adhesión.

Ejemplo 7

Clonación del ADNc que codifica el “antígeno JTT-1” de rata

1. Preparación de la biblioteca de ADNc

1-(1) Extracción de poli(A)⁺ ARN de linfoblastos de rata estimulados con ConA

Se centrifugaron linfoblastos estimulados con ConA (blasto ConA) derivados de bazo de rata (aproximadamente 1×10^6 células/ml) ($2.000 \times g$) a 4°C durante 5 minutos. Las células precipitadas se suspendieron con ISOGEN (Nippon Gene) y se extrajeron con cloroformo con agitación para recoger el líquido sobrenadante. Después se añadió isopropanol al líquido sobrenadante obtenido, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a $12.000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos para precipitar el ARN. El ARN precipitado se lavó con etanol y se disolvió en tampón de TE. El poli(A)⁺ ARN se purificó del ARN total obtenido con el “kit de purificación de ARNm” (Pharmacia).

1-(2) Preparación del ADNc

Con 5 µg del poli(A)⁺ ARN preparado antes como molde, se sintetizó el ADNc con el “kit de síntesis de ADNc Time Saver” (Pharmacia). Se usó el “cebador oligo dT” (Pharmacia) que no tiene sitio NotI para aumentar la eficacia del cribado. Se añadió adaptador EcoRI, y se realizó la digestión con NotI para obtener el ADNc unidireccional. Después se llevó a cabo el fraccionamiento por tamaños con columna Spun (Pharmacia).

1-(3) Inserción en un vector

El ADN obtenido que tenía terminaciones EcoRI y NotI se ligó con pME18S (Hara, T. & Miyajima, A., *EMBO J.*, Vol. 11, pp.1875-1884 (1992)) digerido con EcoRI u NotI. Se usó el “kit de ligación de ADN” (Takara Shuzo) para la ligación. Se transformaron células DH5 de *E. coli* (Toyobo) con el producto de reacción obtenido. Los transformantes se cultivaron hasta que el valor de D.O. (a 600 nm) alcanzó 0,6 y se recogieron para recuperar los ADN plásmidos con una biblioteca. Se usó QUIAGEN-Tip (QUIAGEN) para la purificación de los ADN plásmidos.

2. Cribado de la biblioteca de ADNc

El cribado se realizó de acuerdo con el procedimiento de cribado (Seed, B. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp.3365-3369 (1987)).

2-(1) Transferencia de genes a células COS

La biblioteca así obtenida se introdujo en células COS7 por electroporación (Potter, H. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85, pp.2288-2292). Los transformantes se cultivaron durante 60 horas después de la introducción, se separó el líquido sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con PBS. Después el sedimento se trató con PBS (que contenía EDTA 0,5 mM) a 37°C durante 30 minutos, y las células se separaron con pipeta. Después sólo se recogieron las células vivas con “Lymphprep” (NYCOMED).

2-(2) Concentración de las células que expresan genes mediante cribado

Las células vivas obtenidas antes se suspendieron en PBS (que contenía FCS al 5% y EDTA 0,5 mM). La suspensión celular se transfirió a un disco de cultivo recubierto con “anticuerpo JTT-1” y se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después las células que no se unían a la placa de cultivo se separaron y la placa de cultivo se lavó con PBS 3 veces, y se recogieron los ADN plásmidos de las células que se unían a la placa de cultivo por el procedimiento de Hirt (Hirt, B., *J. Mol. Biol.*, Vol. 26, pp.365-369). Se transformaron DH10B de *E. coli* (GIBCO BRL) con

ES 2 285 763 T3

el ADN plásmido obtenido. Los ADN plásmidos se amplificaron y se purificaron con los transformantes como se ha mencionado en 1-(3). Después se repitieron dos veces los procedimientos descritos en (1) y (2).

2-(3) Aislamiento del clon positivo

Después del tercer cribado, las células DH10B de *E. coli* transformadas se cultivaron toda la noche en placas de LB que contenían ampicilina para obtener colonias. Se cultivaron 20 colonias resistentes a fármaco, se recogieron los ADN plásmidos por el procedimiento de Miniprep alcalino (Maniatis, T. y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), y se analizó el ADN inserto. La electroforesis en gel de agarosa puso de manifiesto que se había concentrado el clon que tenía ADNc de aproximadamente 0,9 kb (denominado "T132A7").

"T132A7" se expresó transitoriamente en células COS7 otra vez por el procedimiento descrito en (1). Después, las células en las que se había introducido "T132A7" se hicieron reaccionar con el "anticuerpo JTT-1" o el "anticuerpo JTT-2" y después con la IgG anti-ratón marcada con FITC (Cappel), se midió la intensidad de fluorescencia de las células teñidas con el citómetro de flujo (Coulter). El "anticuerpo JTT-1" y "anticuerpo JTT-2" reconocieron fuertemente el producto génico "T132A7". Los resultados se muestran en la figura 8.

3. Determinación de la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos

La secuencia de nucleótidos del clon "T132A7" se determinó por el procedimiento de dideoxi con el "kit de secuenciación Auto Read" (Pharmacia) y el "secuenciador de ADN A.L.F." (Pharmacia). Además, se analizó la secuencia de aminoácidos deducida del "antígeno JTT-1 de rata" codificado por la secuencia de nucleótidos, con el software de análisis de genes "GENEWORKS" (IntelliGenetics). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en SEQ ID NO: 4.

La secuencia de aminoácidos (compuesta de 200 restos aminoácidos) deducida del gen clonado comprende la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos N-terminal determinada en el Ejemplo 6-(3). Considerando que las células en las que se ha introducido el clon "T132A7" reaccionan fuertemente con el "anticuerpo JTT-1", se puede concluir que el clon "T132A7" comprende el ADNc que codifica el "antígeno JTT-1 de rata".

4. Análisis por ordenador

El análisis de hidropatía de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos deducida del "antígeno JTT-1" se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Kite y Doolittle (Kite, J. & Doolittle, R. F., J. *Mol. Biol.*, Vol. 157, pp.105-132 (1982)) (figura 9). Los resultados pusieron de manifiesto que el "antígeno JTT-1" es una proteína transmembrana que tiene una secuencia señal en el extremo N. Además, los resultados del análisis del motivo pusieron de manifiesto que el "antígeno JTT-1" tiene dos sitios de unión de cadenas de azúcar unidos por Asn en el dominio extracelular, y dos sitios de fosforilación por caseína quinasa y un sitio de fosforilación por proteína quinasa C en el dominio citoplasmático. En la figura 9 "CHO" significa sitio de unión de cadena de azúcar unida por N; "P", sitio de fosforilación; "CKII", caseína quinasa II; y "PKC", proteína quinasa C.

Ejemplo 8

Clonación del ADNc que codifica el "antígeno JTT-1 humano"

1. Preparación de una sonda

El ADNc (aproximadamente 0,9 kb) que codifica el "antígeno JTT-1 de rata" se generó por digestión del clon "T132A7" obtenido en el Ejemplo 7 con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, y se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN separados se purificaron con el "kit de extracción en gel QUIAEX" (QUIAGEN), y los fragmentos de ADN obtenidos se marcaron con ³²P usando el "kit de marcaje de ADN Ready-TO-GO" (Pharmacia). Estos fragmentos de ADN marcados se usaron como sondas para la hibridación en placa.

2. Preparación de la biblioteca de ADNc

2-(1) Extracción de poli(A)⁺ ARN

El poli(A)⁺ ARN se extrajo de los linfoblastos estimulados con ConA (ConA-blasto) derivados de sangre periférica humana de la misma forma que en el Ejemplo 7-1-(1).

2-(2) Preparación de ADNc

Con 5 µg de poli(A)⁺ ARN así preparado como molde, se sintetizaron ADNc con "cebador oligo dT" (Pharmacia) y "kit de síntesis de ADNc Time Saver" (Pharmacia). Después se añadió adaptador EcoRI, y se llevó a cabo el fraccionamiento por tamaños con columna Spun (Pharmacia).

2-(3) Inserción en un vector y empaquetamiento

Los ADNc obtenidos que tienen terminaciones EcoRI se ligaron con el vector “λZAPII” (Stratagene) digerido con EcoRI. Se usó el “kit de ligación de ADN” (Takara Shuzo) para la ligación. Después, se llevó a cabo el empaquetamiento del ADN ligado *in vitro* con “GIGA PACK II GOLD” (Stratagene), se transfectaron células de *E. coli* XLBlue MRF” (Stratagene) con la partícula fago obtenida para generar una biblioteca de ADNc compuesta de placa que comprendía el fago recombinante.

3. Cribado de la biblioteca de ADNc

Se seleccionó la biblioteca de ADNc por el procedimiento de hibridación en placa (Maniatis, T. y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) con “tampón de hibridación rápida” (Amersham). Primero se puso en placa la biblioteca de ADNc obtenida (1×10^4) en placas de agar y los replicones se produjeron con “membrana de nailon Hybond-N” (Amersham). La hibridación en placa se llevó a cabo en “tampón de hibridación rápida” (Amersham) usando los replicones y la sonda marcada con ^{32}P preparada en el Ejemplo 8-1. Se llevaron a cabo el primer y segundo cribado para obtener 8 clones positivos. Se aislaron las placas individuales de cada clon y se sometieron a escisión *in vivo* de acuerdo con el manual (Stratagene) y se recogieron 7 clones positivos como ADN plásmido.

4. Determinación de la secuencia de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos de los 7 clones se determinaron por el procedimiento de dideoxi con el “kit de secuenciación Auto Read” (Pharmacia) y el “secuenciador de ADN A.L.F.” (Pharmacia). Los 7 clones comprenden la misma secuencia de nucleótidos. Se encontró que el clon “pBSh41” codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 humano” entero. La secuencia del ADNc correspondiente al marco de lectura abierto (ORF) del “antígeno JTT-1 humano” se muestra en SEQ ID NO: 1, la longitud entera de la secuencia de aminoácidos deducida del “antígeno JTT-1 humano” se muestra en SEQ ID NO: 2, y la secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias 5' y 3' se muestra en SEQ ID NO: 3 (el ORF corresponde a los restos nucleótidos 26 a 625). Se entiende que la secuencia de nucleótidos contenida en el clon codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 humano” porque la secuencia de aminoácidos (compuesta de 199 restos aminoácidos) deducida de la secuencia de nucleótidos muestra una homología significativa con la secuencia de aminoácidos del “antígeno JTT-1 de rata” (figura 10). Como se muestra en la figura 10, la homología entre las secuencias de aminoácidos del “antígeno JTT-1” humano y de rata es 60% o más.

DH10B de *E. coli* (GIBCO BRL) transformada con el clon “pBSh41” se ha depositado según el Tratado de Budapest con la autoridad de depósito internacional, Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Ministerio de Comercio Internacional e Industria, Japón (1-1-3, Higashi, Tsukubashi, Ibaraki, Japón) desde el 25 de Octubre de 1996 (un n° de acceso del depósito internacional FERM BP-5725).

5. Características estructurales y función biológica del “antígeno JTT-1”

Los resultados de la búsqueda de motivos para la secuencia de aminoácidos deducida del “antígeno JTT-1 humano” en proteínas humanas conocidas pusieron de manifiesto que el “antígeno JTT-1 humano” tiene similitud estructural con “CD28” y “CTLA-4”, proteínas de membrana celular derivadas de ser humano pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, mencionado antes con detalle (figuras 11 y 12). Como se ha mencionado antes “CD28” y “CTLA-4” son moléculas extremadamente importantes que regulan la activación e inhibición de las células T en el sistema inmunitario.

La similitud estructural es la siguiente

1. 20 o más restos aminoácidos incluidos los restos de cisteína muy conservados

2. La secuencia de prolina que se repite, “Pro-Pro-Pro (PPP)”, que es esencial como la región de unión del ligando en CD28 y CTLA-4, está conservada.

3. “Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM)” (Xaa y x representan cualquier aminoácido) secuencia esencial como la región de transmisión de señal en CD28 y CTLA-4 está conservada en la región citoplasmática.

A partir del hecho de que la misma estructura con la estructura específica de “CD28” y “CTLA-4”, que tiene una función importante en la regulación de la activación de las células T que son un actor principal en el mecanismo inmunitario, se deduce que el “antígeno JTT-1” de la presente invención tiene una función importante al igual que esas moléculas, en la regulación de la activación de los linfocitos, tales como las células T que son actores principales en la respuesta inmunitaria.

Ejemplo 9

Clonación del ADNc que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón”

5 1. Preparación de una sonda

El ADNc (aproximadamente 0,9 kb) que codifica el “antígeno JTT-1 de rata” se obtuvo por digestión del clon “T132A7”, clonado en el Ejemplo 7, con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, y se separó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN separados se purificaron con “kit de extracción en gel QUIAEX” (QUIAGEN), y los fragmentos de ADN se marcaron con ³²P usando “kit de marcaje de ADN Ready-To-Go” (Pharmacia). Estos fragmentos de ADN marcados se usaron como una sonda para la hibridación en placa.

2. Preparación de la biblioteca de ADNc

15 2-(1) Extracción de poli(A)⁺ ARN

Como en el Ejemplo 7-1-(1), los poli(A)⁺ ARN se extrajeron de los linfoblastos estimulados con ConA derivados de bazo de ratón (aproximadamente 1 x 10⁶ células/ml).

20 2-(2) Preparación de la biblioteca de ADNc

Con 5 mg de los poli(A)⁺ ARN preparados antes como molde, se sintetizaron los ADNc con el cebador oligo dT (Pharmacia) y el “kit de síntesis de ADNc Time Saver” (Pharmacia). Después de añadir el adaptador de EcoRI al ADNc, se llevó a cabo el fraccionamiento por tamaños con la columna Spun (Pharmacia).

25 2-(3) Inserción del ADNc en un vector y empaquetamiento

Los ADNc obtenidos que tienen terminaciones EcoRI se ligaron con el vector λZAPII (Stratagene) digerido con EcoRI. Se usó el “kit de ligación de ADN” (Takara Shuzo) para la ligación. Después, se llevó a cabo el empaquetamiento del ADN ligado *in vitro* con GIGA PACK II GOLD (Stratagene), se transfectaron células de *E. coli* XL1Blue MRF’ (Stratagene) con la partícula fago obtenida para generar una biblioteca de ADNc compuesta de placa que comprendía el fago recombinante.

30 3. Cribado de la biblioteca de ADNc

El cribado se llevó a cabo por el procedimiento de hibridación en placa (Maniatis, T. y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) usando “tampón de hibridación rápida” (Amersham).

La biblioteca de ADNc obtenida antes (1 x 10⁴) se puso en placa en placas de agar y se produjeron los replicones usando membrana de nailon Hybond-N (Amersham). La hibridación en placa se llevó a cabo en tampón de hibridación rápida (Amersham) usando los replicones y la sonda marcada con ³²P preparada en el Ejemplo 9-1. Se llevaron a cabo el primer y segundo cribado para obtener 5 clones positivos. Después, se aislaron las placas individuales de cada clon, se llevó a cabo la escisión *in vivo* de acuerdo con el manual de instrucciones (Stratagene) y se recogieron 5 clones positivos como ADN plásmido.

4. Determinación de la secuencia de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos de cada uno de los 5 clones se determinaron por el procedimiento de didesoxi con el “kit de secuenciación Auto Read” (Pharmacia) y el “secuenciador de ADN A.L.F.” (Pharmacia). Cuatro de los cinco clones comprenden la misma secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 de ratón” y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en SEQ ID NO: 5.

Como se comprende a partir de la figura 10, el “antígeno JTT-1 de ratón” está compuesto de 200 restos aminoácidos como el “antígeno JTT-1 de rata”. La homología entre las secuencias de aminoácidos de los “antígenos JTT-1” de ratón, rata y humano es significativa (60% o más).

5. Análisis del locus del gen del “antígeno JTT-1 de ratón”

El locus del gen que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se analizó por el procedimiento de hibridación de fluorescencia *in situ*

El ADNc obtenido que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se marcó con ³²P para preparar las sondas de hibridación por el procedimiento habitual. Usando estas sondas se cribó la biblioteca de ADN genómico de ratón 129 SVJ (Stratagene) para obtener clones de ADN genómico de ratón que comprenden los exones que codifican el “antígeno JTT-1 de ratón”. La estructura del ADN genómico se muestra esquemáticamente en la figura 13.

Los clones de ADN genómico obtenidos antes se marcaron con digoxigenina-dUTP por traslación de mellas para preparar las sondas. Las sondas marcadas se unieron al ADN de ratón escindido y se hibridaron con cromosomas en metafase normal derivados de fibroblastos embrionarios de ratón en una solución que contenía formaldehído al 50%, sulfato de dextrano al 10%, y 2 x SSC. Después de incubación en portaobjetos para la hibridación en anticuerpo anti-digoxigenina con marcador fluorescente, se detectó la señal específica de hibridación por tinción con DAPI. En el primer ensayo, se marcó específicamente la parte cerca del cromosoma mayor que se pensaba que era el cromosoma 1 a juzgar por el tamaño del ADN y la banda aparecida. Basándose en esta información, el clon de ADN genómico descrito antes se cohibridó con sondas específicas para la región del centrómero del cromosoma 1. Como resultado se marcaron específicamente la región del centrómero del cromosoma 1 y las regiones cercanas a ella. Se analizaron 10 muestras del cromosoma 1 que mostraban la hibridación específica, y se puso de manifiesto que el clon de ADN genómico mencionado antes estaba situado en una posición a una distancia de 33% desde el borde entre la heterocromatina y eucromatina al telómero del cromosoma 1, es decir, en la misma banda "1C3" como los loci de los genes "CD28" y "CTLA-4" de ratón. Como resultado de las 80 células en metafase analizadas, se identificaron los marcajes específicos en dicha posición para 79 células.

Estos resultados y los resultados obtenidos en el Ejemplo 8 que indican la similitud estructural del "antígeno JTT-1" con "CD28" y "CTLA-4", sugieren que el "antígeno JTT-1", como "CD28" y "CTLA-4", es una molécula importante implicada en la regulación de la transmisión de señal coestimuladora y/o activación de linfocitos.

Ejemplo 10

Clonación del ADNc que codifica un mutante del "antígeno JTT-1 de rata"

Se clonó como sigue otro ADNc que se cree que codifica la variante de religación del "antígeno JTT-1 de rata" clonado en el Ejemplo 7.

1. Preparación de una sonda

El ADNc (aproximadamente 0,9 kb) que codifica el "antígeno JTT-1 de rata" se generó por digestión del clon "T132A7", clonado en el Ejemplo 7, con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, y se separó por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN separados se purificaron con el "kit de extracción en gel QUIAEX" (QUIAGEN), y los fragmentos de ADN obtenidos se marcaron con ³²P usando el "kit de marcaje de ADN Ready-To-Go" (Pharmacia). Estos fragmentos de ADN marcados se usaron como sondas para la hibridación en placa.

2. Preparación de la biblioteca de ADNc

2-(1) Extracción de poli(A)⁺ ARN

Como en el Ejemplo 7-1-(1), el poli(A)⁺ ARN se extrajo de la línea celular de timoma de rata FTL435 (aproximadamente 1 x 10⁶ células/ml).

2-(2) Preparación de la biblioteca de ADNc

Con 5 mg del poli(A)⁺ ARN preparado como se ha mencionado antes como molde, se sintetizaron los ADNc con el cebador oligo dT (Pharmacia) y el "kit de síntesis de ADNc Time Saver" (Pharmacia). Después de añadir el adaptador de EcoRI al ADNc, se llevó a cabo el fraccionamiento por tamaños con la columna Spun (Pharmacia).

2-(3) Inserción del ADNc en un vector y empaquetamiento

Los ADNc obtenidos antes que tienen extremos EcoRI se ligaron con el vector λZAPII (Stratagene) digerido con EcoRI. Se usó el "kit de ligación de ADN" (Takara Shuzo) para la ligación. Después, se llevó a cabo el empaquetamiento del ADN ligado *in vitro* con GIGA PACK II GOLD (Stratagene), se transfectaron células de *E. coli* XL1Blue MRF' (Stratagene) con la partícula fago obtenida para generar una biblioteca de ADNc compuesta de placa que comprendía el fago recombinante.

3. Cribado de la biblioteca de ADNc

El cribado se llevó a cabo por el procedimiento de hibridación en placa (Maniatis, T. y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) con "tampón de hibridación rápida" (Amersham).

La biblioteca de ADNc preparada antes (1 x 10⁴) se puso en placa en placas de agar y se produjeron los replicones usando membrana de nailon Hybond-N (Amersham). La hibridación en placa se llevó a cabo en tampón de hibridación rápida (Amersham) usando los replicones y la sonda marcada con ³²P preparada en el Ejemplo 10-1. Se llevaron a cabo el primer y segundo cribado para obtener 2 clones positivos. Después, se aislaron las placas individuales de cada clon, se llevó a cabo la escisión *in vivo* de acuerdo con el manual de instrucciones (Stratagene) y se recogieron 2 clones positivos como ADN plásmido.

4. Determinación de la secuencia de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos de los 2 clones se determinaron por el procedimiento de dideoxi con el “kit de secuenciación Auto Read” (Pharmacia) y el “secuenciador de ADN A.L.F.” (Pharmacia). Los dos clones comprenden la misma secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 de rata” obtenido y la secuencia de aminoácidos deducida se muestran en SEQ ID NO: 6. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) deducida a partir de la secuencia de ADNc obtenida se comparó con la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) deducida a partir de la secuencia de ADNc obtenida que codifica el “antígeno JTT-1 de rata” clonado en el Ejemplo 7 (figura 14). Como se muestra en la figura 14, la secuencia de aminoácidos que codifica el ADNc clonado en este ensayo era completamente igual que la codificada por el ADNc que codifica el “antígeno JTT-1 de rata” obtenido en el Ejemplo 7, excepto que (1) los tres restos aminoácidos continuos C-terminales (Met-Thr-Ser) cambian a Thr-Ala-Pro, y que (2) después de the Thr-Ala-Pro, hay añadidos 16 restos aminoácidos continuos (Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Glu-His-Ser-Ser-Cys-Gln-Asp-Arg-Asn). Esto indica que el ADNc clonado en este ensayo codifica la variante de religación alternativa del “antígeno JTT-1 de rata” obtenido en el Ejemplo 7.

Ejemplo 11

Preparación de células que expresan el “antígeno JTT-1 humano” recombinante

El clon plásmido pBSh41 obtenido en el Ejemplo 8 se hizo digerir con una enzima de restricción EcoRI, y se escindió un fragmento de ADN que comprendía el ADNc que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 humano”. Este fragmento de ADN se insertó con el kit de ligación de ADN (Takara Shuzo) en un plásmido pEFneo (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp.158-162 (1994)) tratado con la misma enzima de restricción EcoRI para preparar el vector de expresión. Se transformaron células CHO-K1 (ATCC: CCL-61) con el vector por electroporación. Cultivando las células en medio RPMI1640 que contenía geneticina 0,8 mg/ml (GIBCO BRL) y suero de ternero fetal al 10% durante aproximadamente 2 semanas, se seleccionaron los transformantes resistentes a la geneticina. La expresión del “antígeno JTT-1 humano” recombinante se confirmó por transferencia Northern por el procedimiento habitual.

Ejemplo 12

Preparación de los anticuerpos monoclonales contra el “antígeno JTT-1 humano”

Los transformantes que expresaban el “antígeno JTT-1 humano” recombinante preparados en el Ejemplo 11 se homogeneizaron y se ultracentrifugaron (100.000 x g). El sedimento que contenía la fracción de membrana celular se recogió y se suspendió en PBS. La suspensión resultante que comprendía la fracción de membrana celular se inyectó en la almohadilla de la pata de un ratón BALB/c con adyuvante de Freund para la primera inmunización (día 0). Después se administró el antígeno de la fracción de membrana celular en la almohadilla de la pata a intervalos de 7, 14 y 28 días. Dos días después de la última inmunización, se cogieron las células del nódulo linfático. Se mezclaron las células del nódulo linfático y las células de mieloma de ratón PAI (JCR No. B0113; *Res. Disclosure*, Vol. 217, p.155 (1982)) en una proporción de 5:1, se fusionaron usando polietilenglicol 4000 (GIBCO) como agente de fusión para preparar los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Los hibridomas se cribaron cultivándolos en medio ASF104 que contenía HAT (Ajinomoto) complementado con suero de ternero fetal al 10% y aminopterina. El líquido sobrenadante del cultivo de cada hibridoma se hizo reaccionar con los transformantes que expresan el “antígeno JTT-1 humano” recombinante preparados en el Ejemplo 11, y se midió la intensidad de fluorescencia de las células teñidas haciéndolas reaccionar con la IgG anti-ratón marcada con FITC (Cappel) con el citómetro de flujo EPICS-ELITE para confirmar la reactividad del anticuerpo monoclonal generado en cada líquido sobrenadante de cultivo frente al “antígeno JTT-1 humano”. Se ha confirmado que se obtuvieron 10 o más clases de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales reactivos frente al “antígeno JTT-1 humano”.

Cada uno de los dos tipos (designados clon SA12 y SG430) de estos hibridomas (10^6 a 10^7 células/0,5 ml/ratón) se inyectó en un ratón ICR nu/nu (hembra, 7-8 semanas de edad) por vía intraperitoneal. Después de 10 a 20 días, se llevó a cabo la celiotomía de los ratones con anestesia, y se prepararon los dos tipos de anticuerpos monoclonales (SA12 y SG430) reactivos frente al “antígeno JTT-1 humano” en una gran cantidad a partir del líquido de ascitis extraído por el procedimiento habitual.

Ejemplo 13

Efecto de los anticuerpos monoclonales contra el “antígeno JTT-1 humano” en linfocitos de la sangre periférica humana

Como se ha mencionado en el Ejemplo 8, se cree que el “antígeno JTT-1” puede estar implicado en la regulación de la activación de linfocitos en la reacción inmunitaria como “CD28” y “CTLA-4”. Con el fin de probar esto, se analizó el efecto de los anticuerpos monoclonales contra el “antígeno JTT-1 humano” en linfocitos humanos a la luz del crecimiento celular como indicación.

A cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos se añadieron (1) SA12 o SG430 (1 μ g/ml), el anticuerpo monoclonal contra el “antígeno JTT-1 humano” preparado en el Ejemplo 12, o (2) una mezcla del anticuerpo monoclonal SA12 o SG430 (1 μ g/ml) con anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT-3 (1 μ g/ml, Orthodiagnostic Sys-

tems), que se usa para añadir la señal primera en la activación de los linfocitos. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora para recubrir cada pocillo con el anticuerpo. Después de lavar la placa con medio RPMI1640, se añadieron linfocitos de sangre periférica humana normal (1×10^5 células/pocillo) a cada pocillo y se incubaron en medio RPMI1640 que contenía suero de ternero fetal al 10% durante 3 días. Si era necesario, se añadía miristato-acetato de forbol 1 ng/ml (PMA). Después se añadió [^3H]-timidina ($3,7 \mu\text{Bq/pocillo}$) a cada pocillo, y la placa se incubó a 37°C durante 6 horas. Se recogieron las células y se midió la cantidad de [^3H]-timidina incorporada en el ADN con un contador de centelleo de líquidos (Beckman). Se usó un ensayo sin ningún anticuerpo como control. Los resultados se muestran en la figura 15.

En el ensayo que usaba las placas recubiertas con anticuerpo monoclonal SA12 o SG430, el número de linfocitos aumentó aproximadamente 10 veces comparado con el control. Junto con la presencia de OKT3, el número de linfocitos aumentó aproximadamente 100 veces cuando se usó el anticuerpo monoclonal SA12 o SG430.

Estos resultados indican que el “antígeno JTT-1” funciona en la regulación de la activación de linfocitos. El hecho de que la tasa de crecimiento celular aumentara usándolo junto con OKT3 indica que el “antígeno JTT-1” está implicado en la transmisión de señal coestimuladora como “CD28” y “CTLA-4”.

Ejemplo 14

Efecto del “anticuerpo JTT-2” en la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)

Como se ha mencionado antes con detalle, recientemente se han hecho muchos intentos de tratar las enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmune, dermatitis de contacto alérgica, dermatosis inflamatoria crónica tal como liquen plano, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de insulina, psoriasis, etc.) regulando la transmisión entre CD28/CTLA-4 y CD80/CD86. El efecto ya se ha confirmado en diferentes animales modelo de enfermedades autoinmunes ((1) un modelo para el lupus eritematoso sistémico (LES), (2) encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo para la esclerosis múltiple (EM), (3) un modelo para la diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), (4) modelo de nefritis de Goodpasture, y (5) artritis reumatoide humana).

Con el fin de determinar si el “antígeno JTT-1” de la presente invención es una molécula implicada en la activación o inhibición de linfocitos tales como “CD28” y “CTLA-4”, se produjeron ratas modelo para la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo para la esclerosis múltiple (EM), y se analizó el efecto del anticuerpo monoclonal indicado en el “antígeno JTT-1” en el modelo.

Se preparó una emulsión para usar como inmunógeno mezclando homogeneizado cerebroespinal de cobaya Hartley (800 mg/ml en solución salina fisiológica) con la misma cantidad de adyuvante completo de Freund. La inmunización se realizó mediante inyección intradérmica de la emulsión en las almohadillas de las patas izquierda y derecha de 15 ratas Lewis (hembra, 6 semanas de edad) en una cantidad de 0,25 ml por almohadilla de pata. La administración (inmunización) se ajustó para que las dosificaciones del homogeneizado preparado fueran 200 mg por rata. Esta inmunización induce encefalomiелitis alérgica experimental (EAE).

Las ratas inmunizadas de esta forma se dividieron en tres grupos de 5 ratas cada uno, y se inyectó por vía intravenosa cualquiera del (1) a (3) siguientes a los ratones de cada grupo inmediatamente después de la inmunización (día 0), y 3, 6, 9 y 12 días después de la inmunización.

(1) Anticuerpo monoclonal “anticuerpo JTT-2” contra “antígeno JTT-1 de rata” preparado en el Ejemplo 2 (dosificación: PBS 2 mg/ml, 5 mg/kg)

(2) Prednisolona, agente esteroide (dosificación: PBS 4 mg/ml, 10 mg/kg)

(3) Anticuerpo control no reactivo frente al “antígeno JTT-1 de rata” (dosificación: PBS 2 mg/ml, 5 mg/kg)

Se observaron los síntomas en el transcurso del tiempo después de la inmunización. Después del inicio de la EAE, el grado de los síntomas se calculó puntuando los síntomas basándose en los siguientes criterios

(Puntuación 1) Desaparición de la tensión en la cola

(Puntuación 2) Arrastra las patas traseras y parálisis leve

(Puntuación 3) Arrastra las patas traseras y parálisis grave

(Puntuación 4) Parálisis de todo el cuerpo o muerte.

Los resultados se muestran en la figura 16. En el grupo en el que se administró el anticuerpo de control, los síntomas de la EAE alcanzaron el máximo (puntuación máxima) el día 11 a 15 después de inmunización, y después se recuperaron gradualmente. En contraste, en el grupo que se administró “anticuerpo JTT-2”, se inhibieron significativamente los síntomas de la EAE el día 11 después de la inmunización. Este efecto inhibidor era significativamente mayor que en el grupo al que se había administrado prednisolona.

Estos resultados indican que el “antígeno JTT-1” es una molécula que funciona en la inducción de la respuesta inmunitaria tal como la activación de linfocitos inducida por inmunización por antígenos extraños, y que la regulación de la función del “antígeno JTT-1” o su ligando puede inhibir los síntomas de diferentes enfermedades autoinmunes.

5 Ejemplo 15

Efecto del “anticuerpo JTT-2” en la glomerulonefritis

Con el mismo propósito que en el Ejemplo 14, se produjeron ratas modelo de nefritis de membrana basal glomerular (GBM), y se analizó el efecto de este anticuerpo monoclonal indicado en el “antígeno JTT-1” en el modelo.

Después de digestión de la membrana basal glomerular bovina (Shigei Medical Institute) con collagenasa, se diluyó con solución salina fisiológica a 200 µg/ml, y la dilución se mezcló con adyuvante completo de Freund para preparar una emulsión para usar como inmunógeno. La inmunización se realizó mediante inyección intradérmica de la emulsión en ambas plantas traseras de 48 ratas wister kyoto (aproximadamente 200 g) con anestesia, en una cantidad de aproximadamente 0,2 ml por almohadilla de pata (dosificación: aproximadamente 15 µg). Esta inmunización induce nefritis de la membrana basal glomerular (GBM).

Las ratas inmunizadas se dividieron en 8 grupos de 6 ratas cada uno, y se inyectó cualquiera del (1) a (3) siguientes a las ratas de cada grupo inmediatamente después de la inmunización (día 0), y 3 veces al día durante 5 semanas consecutivas.

(1) Anticuerpo monoclonal “anticuerpo JTT-2” contra “antígeno JTT-1 de rata” preparado en el Ejemplo 2 (dosificación: PBS 3 mg/ml, (2 ml de PBS/kg), inyección intravenosa)

(2) Prednisolona, agente esteroide, como control positivo (suspendida en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5%) (dosificación: PBS 3 mg/ml, (5 mg/kg), administración oral)

(3) CMC al 0,5% como control negativo (dosificación: 5 mg/ml, administración oral)

Después de administrar un sustrato de ensayo, se administró por vía oral agua esterilizada (25 ml/kg) a cada rata a la fuerza, y se recogió la orina durante 5 horas de cada una de las ratas que se había puesto en una jaula de metabolismo sin alimento ni bebida. Tras medir el volumen de orina recogido, se midió la concentración de proteína urinaria usando Tonein TP-II (Otuka), y se calculó la excreción urinaria de proteína por cinco horas (unidad: mg de proteína/5 horas). La recolección de orina y medición de proteína urinaria mencionadas se realizaron de la misma forma 1, 2, 3 y 4 semanas después de la inmunización (día 0).

Los resultados se muestran en la figura 17. Comparado con el grupo de control, la excreción urinaria de proteína a las 3 semanas después de la inmunización era significativamente menor en el grupo al que se administró “anticuerpo JTT-2”.

Estos resultados indican que el “antígeno JTT-1” es una molécula que induce respuesta inmunitaria tal como la activación de linfocitos inducida por inmunización por antígenos extraños, y que la regulación de la función del “antígeno JTT-1” o sus ligandos puede inhibir los síntomas de diferentes enfermedades autoinmunes.

45 Ejemplo 16

Preparación de la proteína de fusión entre el “antígeno JTT-1” y IgFc

Como se ha mencionado en los Ejemplos 8 y 13 a 15, se cree que el “antígeno JTT-1” de la presente invención es una molécula tal como “CD28” y “CTLA-4”, implicada en la transmisión de señal coestimuladora implicada en la regulación de la activación de linfocitos. Además, como se ha mencionado en el Ejemplo 14, una proteína de fusión (CTLA-4-IgFc) compuesta del dominio extracelular de “CTLA-4” y la región Fc de la inmunoglobulina IgG1 humana supuestamente tiene efectos terapéuticos en diferentes enfermedades autoinmunes. En este Ejemplo, se preparó una proteína de fusión compuesta de la región extracelular del “antígeno JTT-1” y la IgG1 humana como sigue con el fin de examinar si el antígeno JTT-1 soluble, como CTLA-4-IgFc, se podía aplicar para la terapia de diferentes enfermedades autoinmunes.

(1) Preparación de la proteína de fusión entre el “antígeno JTT-1 de rata” y la IgG1-Fc humana (rJTT-1-IgFc)

Con el fin de amplificar el ADNc que codifica la región extracelular del “antígeno JTT-1 de rata” por PCR, se diseñaron y sintetizaron el cebador 5' que tiene el sitio de restricción XhoI (5'-CTGCTCGAGATGAAGCCC TACTTCTCG-3', SEQ ID NO: 7) y el cebador 3' que tiene el sitio de restricción BamHI (5'-ACCCTACGGGTAACG GATCCTTCAGCTGGCAA-3', SEQ ID NO: 8) en sus extremos. Usando el clon de ADNc “T132A7” obtenido en el Ejemplo 7 que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1” de rata como molde, se llevó a cabo la PCR con los cebadores para preparar el ADNc que comprendía el ADNc que codifica la región extracelular del “antígeno JTT-1 de rata” que tiene los sitios de restricción XhoI y BamHI en sus dos extremos. Los productos de la PCR obtenidos se hicieron digerir con XhoI y BamHI y se separaron por electroforesis en gel de agarosa para aislar una banda de

aproximadamente 450 pb prevista como el fragmento de ADNc que codifica una región extracelular deseada. El fragmento de ADNc aislado se subclonó en pBluscript II SK (+) (Stratagene) escindido con XhoI y BamHI. El análisis de secuencia con un secuenciador de ADN de fluorescencia automático (Applied Biosystems) puso de manifiesto que el fragmento de ADNc comprende la región que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente a los restos aminoácidos 1 a 141 del “antígeno JTT-1 de rata” (SEQ ID NO: 4).

Por otra parte, el ADN que codifica el Fc de la IgG1 humana como pareja de fusión se cortó como un fragmento de ADN BamHI-XbaI de aproximadamente 1,3 kb por digestión del plásmido (véase, *Cell*, Vol. 61, pp.1303-1313 (1990)). Preparado por B. Seed y col. (Massachusetts General Hospital) con BamHI y XbaI. Este fragmento comprende exones que codifican la región bisagra de la IgG1 humana, C γ 2 y C γ 3.

El fragmento XhoI-BamHI que codifica la región extracelular del “antígeno JTT-1 de rata” y el fragmento BamHI-XbaI que comprenden exones que codifican Fc de la IgG1 humana (“IgFc”), preparados ambos como se ha mencionado antes, se subclonaron en pBluscript II SK (+) (Stratagene) escindido con XhoI y XbaI.

Después, el plásmido se hizo digerir con XhoI y XbaI, y se cortó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kb que comprende el ADN de fusión que comprende la región extracelular del “antígeno JTT-1 de rata” y la IgFc humana. Este fragmento de ADN de fusión se insertó en los sitios XhoI y XbaI del vector de expresión pME18S (*Medical Immunology*, Vol. 20, No.1, pp.27-32 (1990); *Experimental Medicine: SUPPLEMENT*, “Handbook of Genetic Engineering”, Yodosha, pp.101-107 (1992)) con ADN T4 ligasa para construir el plásmido prJTT-1-IgFc.

Se transformaron células HEK293 (ATCC CRL1573) cultivadas hasta subconfluencia como monocapa en medio DMEM que contenía suero ternero fetal al 10% y ampicilina, con prJTT-1-IgFc por electroporación para obtener los transformantes.

Los transformantes se cultivaron en medio ASF104 sin suero durante 72 horas para expresar rJTT-1-IgFc.

Se purificó rJTT-1-IgFc usando una columna de afinidad de proteína G-sefarosa (Pharmacia) como sigue.

El líquido sobrenadante obtenido centrifugando el medio de cultivo mencionado antes se cargó en la columna de afinidad de proteína G-sefarosa equilibrada previamente con tampón de unión. Después la columna se lavó con tampón de unión, y la elución se realizó con tampón de elución. El eluato se recogió y se dializó contra tampón de fosfato con intercambio de la solución externa dos o más veces para obtener rJTT-1-IgFc puro.

El resultado de la cromatografía de afinidad se muestra en la figura 18, y el resultado del SDS-PAGE del rJTT-1-IgFc obtenido, en la figura 19.

(2) Preparación de la proteína de fusión entre “antígeno JTT-1 humano” y IgG1-Fc humano (hJTT-1-IgFc)

Se preparó hJTT-1-IgFc como se ha mencionado en (1), excepto por el ADNc usado como molde y los cebadores para la PCR. En este ensayo, se usó el clon “pBSh41” que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 humano” preparado en el Ejemplo 8 como molde, y 5'-TAACTGTTTCTCGAGAACATGAAGTCAGGC-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-ATCCTATGGGTAACGGATCCTTCAGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 10) como cebadores.

El resultado de la cromatografía de afinidad se muestra en la figura 20, y el resultado del SDS-PAGE del hJTT-1-IgFc obtenido en la figura 21.

Ejemplo 17

Preparación de un ratón transgénico en el que se ha integrado el ADNc que codifica el “antígeno JTT-1 de rata”

El ADNc que codifica la longitud entera del “antígeno JTT-1 de rata” obtenido en el Ejemplo 7 se insertó en el vector de expresión pCAGGS (*Gene*, Vol. 108, pp.193-200 (1991)) que tiene el promotor de actina β de pollo, usando el kit de extremos romos de ADN (Takara) para obtener el plásmido, prJTT-1. Con el fin de preparar un ratón transgénico, se linearizó prJTT-1 por tratamiento con enzima de restricción.

Se usó como ratón madre adoptiva un ratón ICR hembra con un tapón vaginal, obtenida por apareamiento de un ratón ICR blanco (Nihon LSC) con un ratón ICR blanco vasoligado macho (Nihon SLC). Se preparó un ratón para obtener huevos fertilizados para introducir el gen del “antígeno JTT-1 de rata” en el mismo, por apareamiento de un ratón BDF-1 hembra (Nihon SLC) a la que se había hecho superovular por administración de PEAMEX (5 unidades, Sankyo Zoki) y Pregnil (5 unidades, Organon) con un ratón BDF-1 macho (Nihon SLC). Después del apareamiento, se extirpó el oviducto del ratón BDF-1 hembra, y se obtuvieron sólo huevos fertilizados por tratamiento con hialuronidasa y se almacenaron en un medio.

El gen del “antígeno JTT-1 de rata” se introdujo en el huevo fertilizado con microscopio usando un manipulador de acuerdo con el procedimiento habitual. El huevo fertilizado se fijó con una aguja de retención. Se microinyectó una solución que contenía el gen linearizado mencionado antes que codifica el “antígeno JTT-1 de rata”, que se diluyó con tampón de Tris-EDTA, en el pronúcleo macho de los huevos fertilizados con una aguja de inyección de ADN a 37°C.

Tras la introducción del gen, se seleccionaron sólo los huevos fertilizados que mantenían un estado normal, y después el huevo fertilizado seleccionado en el que se habían introducidos genes del “antígeno JTT-1 de rata” se insertó en la fimbria ovárica de un ratón madre adoptiva (ratón ICR blanco).

Se cortó la cola de un ratón de la progenie (ratón fundador) nacido del ratón madre adoptiva y se recogió de esta el gen genómico. Por PCR se confirmó que el gen del “antígeno JTT-1 de rata” se había integrado en el genoma de ratón. Después se prepararon ratones transgénicos heterocigotos con expresión alta del “antígeno JTT-1 de rata” por apareamiento de este ratón fundador con un ratón normal. Los ratones transgénicos homocigotos se pueden preparar apareando ratones heterocigotos entre sí.

La construcción microinyectada que comprende el “antígeno JTT-1 de rata” se muestra esquemáticamente en la figura 22.

Ejemplo 18

Preparación de un ratón silenciado cuyo gen endógeno que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se ha inactivado

(1) Construcción de un vector dirigido

Se preparó como sigue un vector dirigido para inactivar (silenciar) el gen endógeno que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” por recombinación homóloga (Nikkei *Science*, pp.52-62 May 1994).

Se subclonó el fragmento PstI-HindIII (“ADN homólogo (1)”) obtenido por digestión del clon de ADN genómico de ratón que comprende la región que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” clonado en el Ejemplo 9-5 con PstI y HindIII en pGEM-3 (Promega). Después, pGEM-3 se linearizó con XhoI, y se insertó el gen de resistencia a la neomicina (“neo”) cortado de pMCI-neo-polyA (Stratagene) por tratamiento con XhoI y SalI secuencia arriba del “ADN homólogo (1)” y después se ligaron. El clon de ADN genómico de ratón mencionado se hizo digerir con XhoI y NotI para cortar un gen de aproximadamente 5,5 kb (“ADN homólogo (2)”) situado secuencia arriba del “ADN homólogo (1)” mencionado. Por separado, el pGEM-3 mencionado antes en el que se había insertado el “neo-ADN homólogo (1)” se hizo digerir con XhoI y HindIII para cortar el “neo-ADN homólogo (1)”. El “ADN homólogo (2)” y “neo-ADN homólogo (1)” así obtenidos se subclonaron en pSEAP2-CONT (Clontech) linearizado con NotI y HindIII.

Después el plásmido obtenido, en el que se había insertado “homólogo (2)-neo-homólogo (1)” se hizo digerir y se linearizó secuencia abajo del “ADN homólogo (1)” con NruI, se insertó el gen de la timidina quinasa (“TK”) obtenido por digestión de pMCI-TK (Stratagene) con PvuII secuencia abajo del “ADN homólogo (1)” para obtener un vector dirigido, en el que se había insertado el “ADN homólogo (2)-neo-homólogo (1)”.

(2) Introducción del vector dirigido en células ES

Células madre embrionarias de ratón (*Nature*, Vol. 362, pp. 255-258 (1993); *Nature*, Vol. 326, pp.292-295 (1987)) cultivadas en medio DMEM que contenía suero ternero fetal al 15% se trató con tripsina para ser células individuales, y las células se lavaron tres veces, seguido de la adición de tampón de fosfato a las mismas para ajustar a 1×10^7 células/ml. El vector dirigido mencionado antes ($25 \mu\text{g}$ por 1 ml de suspensión celular) se añadió a la suspensión de células y se suministró pulso eléctrico una vez en las condiciones de 350 V/cm ($25 \mu\text{F}$). Después se pusieron en placa 1×10^7 células ES en una placa de 10 cm y se cultivaron en medio de mantenimiento durante un día, y se cambió el medio a medio de selección (que contenía G418 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ y ganciclovir $2 \mu\text{M}$). Las células se cultivaron con el medio cambiado cada 2 días. Al décimo día desde la introducción del vector dirigido, se obtuvieron 573 clones de células ES resistentes a la neomicina con microscopio con una micropipeta. Cada uno de los clones de células ES obtenido se cultivó de forma independiente en una placa de 24 pocillos recubierta con células Feeder para obtener 768 replicones de células ES resistentes a la neomicina.

(3) Cribado de las células ES silenciadas

Se confirmó por PCR si el gen endógeno que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se había alterado (silenciado) por recombinación homóloga en cada una de las células ES resistentes a la neomicina.

Para la PCR, se usaron (1) los cebadores diseñados y sintetizados basados en la secuencia mencionada del gen resistente a la neomicina (“neo”) (5'-CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGC-3', SEQ ID NO: 11) y (2) cebadores diseñados y sintetizados basados en la secuencia de “ADN homólogo (1)” mencionada (5'-CATT CAAGTTTCAGGGAACTAGTCCATGCGTTTC-3', SEQ ID NO: 12).

Se extrajo cada ADN genómico de cada una de las células ES resistente a la neomicina, y se llevaron a cabo las PCR usando los cebadores con el ADN genómico como molde. Se llevó a cabo la PCR con 1 ciclo de reacción a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de reacción a 94°C durante 1 minuto, a 60°C durante 1 minuto y a 72°C durante 3,5 minutos, y 1 ciclo de reacción a 72°C durante 10 minutos, y los productos resultantes se almacenaron a 4°C . Cuando se amplificó un fragmento de menos de aproximadamente 4 kb por esta PCR, se pudo considerar que el gen endógeno que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se había alterado (silenciado) por recombinación homóloga en el clon de célula ES.

Se obtuvo un producto de la PCR deseado de tres de los 768 clones de células ES ensayados. Se llevaron a cabo las transferencias southern genómicas para estos tres clones para el cribado y confirmación posteriores. Después de extraer el ADN genómico de los tres clones y hacerlos digerir con la enzima de restricción BamHI, los productos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Los ADN resultantes se transfirieron a membrana de nailon, y se realizó la hibridación con una sonda preparada a partir de la secuencia de ADN genómico que comprende el “JTT-1 de ratón”. La sonda se diseñó basándose en la secuencia exterior del sitio en el que se producía la recombinación homóloga, que permite distinguir el genoma de tipo mutante del genoma de tipo normal en tamaño.

Como resultado, se observaron dos bandas correspondientes al tipo mutante y tipo normal en uno de los tres clones. Este clon de célula ES se usó para preparar un ratón silenciado descrito a continuación.

(4) Preparación de un ratón silenciado

Las células ES obtenidas (15 células ES por blastocito) cuyo gen endógeno que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” se había inactivado (silenciado) por recombinación homóloga, se microinyectaron en blastocitos, que se obtuvieron por apareamiento de un ratón hembra C57BL6 (Nihon Charles River) con un macho. Inmediatamente después de la microinyección, los blastocitos (aproximadamente 10 blastocitos por una cara del útero) se transplantaron al útero de un ratón ICR madre adoptiva (CLKEA Japón), que era un ratón de 2,5 días desde el tratamiento de pseudopreñado. Como resultado se obtuvo en total una progenie de 38 ratones, de los cuales 18 eran ratones quiméricos deseados. De los ratones quiméricos 11 eran el ratón quimérico en el que la contribución al color del pelo era 80% o más.

Los ratones quiméricos obtenidos después se aparearon con un ratón C57BL6 normal para obtener un ratón agutí cuyo color deriva del gen del color de pelo de las células ES.

Ejemplo 19

Preparación de la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo

Cada uno de los anticuerpos monoclonales (50-150 µg/ml), “anticuerpo JTT-1” y “anticuerpo JTT-2” contra el “antígeno JTT-1 de rata”, preparado en el Ejemplo 1, y los anticuerpos monoclonales, “SA12” y “SG430” contra el “antígeno JTT-1 humano”, preparado en el Ejemplo 12, se añadieron a agua destilada inyectable (10 ml) para preparar la inyección.

Aplicabilidad industrial

Las nuevas moléculas de superficie celular (llamadas “antígeno JTT-1”) descritas en el presente documento y obtenidas de mamíferos tales como ser humano, ratón y rata, se caracterizan como sigue.

(1) El “antígeno JTT-1” tenía la siguiente similitud con “CD28”, una molécula de superficie celular en linfocitos tales como células T, que transmite señal coestimuladora importante para la activación de las células T por adhesión celular, y “CTLA-4”, una molécula de superficie celular en linfocitos tales como células T, que regula la función de los linfocitos activados tales como las células T activadas, cooperando con la señal.

(i) 20 o más restos aminoácidos incluidos los restos de cisteína son muy conservados.

(ii) La secuencia de repetición de prolina “Por-Pro-Pro (PPP)”, que es esencial como región de unión del ligando, está conservada en la región extracelular.

(iii) La secuencia “Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM)” (Xaa y x representan cualquier aminoácido), secuencia esencial como región de transmisión de señal, está conservada en la región citoplasmática.

(iv) El locus del gen que codifica el “antígeno JTT-1 de ratón” en el cromosoma de ratón era “1C3”, como “CD28” y “CTLA-4”.

(2) El “antígeno JTT-1” puede mediar la adhesión celular de timocitos, linfoblastos estimulados con mitógeno tal como ConA, timomas, como “CD28” y “CTLA-4” que median la adhesión celular.

(3) El “antígeno JTT-1” es muy expresado, al menos en timocitos, células linfoblastos estimuladas con mitógeno tal como ConA (células linfoblastos T activadas y células linfoblastos B activadas, etc.), linfocitos de la sangre periférica y timomas.

(4) El anticuerpo contra el “antígeno JTT-1” hace proliferar significativamente los linfocitos de la sangre periférica humana, y la proliferación está más potenciada en presencia de un anticuerpo monoclonal contra CD3 que constituye el complejo TcR/CD3 en las células T, que recibe la señal primera esencial para la activación de las células T por las células presentadoras de antígeno.

(5) La administración del anticuerpo contra el “antígeno JTT-1” inhibe significativamente los síntomas de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE).

(6) La administración del anticuerpo contra el “antígeno JTT-1” a una rata modelo de la nefritis de membrana basal glomerular (GBM) inhibe significativamente los síntomas de esta enfermedad.

5 Se cree que el “antígeno JTT-1” descrito en el presente documento, como “CD28” y “CTLA-4”, es una molécula que transmite la señal secundaria (señal coestimuladora) esencial para la activación de linfocitos como células T, y que regula la función de los linfocitos activados tales como las células T activadas, cooperando con la señal.

10 Por lo tanto, los polipéptidos de la presente invención que constituyen dichas moléculas de superficie celular humana, su fragmento de polipéptido y los polipéptidos de fusión a partir de estos, y los anticuerpos para los mismos, descritos en el presente documento, pueden proporcionar productos farmacéuticos muy útiles para la terapia o prevención de diferentes enfermedades inflamatorias, específicamente, dermatosis inflamatoria crónica tal como el liquen plano, producido por la activación de linfocitos tales como células T y la anomalía de la regulación de las funciones de linfocitos activados.

15 Igualmente, los genes que codifican los polipéptidos de la presente invención o los fragmentos de polipéptidos descritos en el presente documento, se pueden usar no sólo en terapia génica de las diferentes enfermedades mencionadas antes, si no también en la preparación de productos farmacéuticos antisentido.

20 Entre los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos monoclonales humanos y sus composiciones farmacéuticas han aumentado notablemente el valor farmacéutico de los fármacos de anticuerpos porque no tienen antigenicidad contra el ser humano, lo cual ha sido un problema grave (efecto secundario) de los productos farmacéuticos de anticuerpos que contenían anticuerpos derivados de mamíferos no humanos, tales como los anticuerpos derivados de ratón.

25 Los genes (ADN), polipéptidos y anticuerpos de la presente invención, y los fragmentos de polipéptidos descritos en el presente documento, son útiles no sólo como productos farmacéuticos, si no también como reactivos para buscar moléculas (ligandos) que interaccionen con las moléculas de superficie celular descritas en el presente documento, aclarando la función del ligando, y desarrollando fármacos dirigidos a ligandos.

30 Además, el ratón transgénico descrito en el presente documento es extremadamente útil no solo como un modelo animal para estudiar la función fisiológica del “antígeno JTT-1” que es una molécula de superficie celular descrita en el presente documento, si no también como herramienta para el cribado de diferentes fármacos (compuestos de bajo peso molecular, anticuerpos, sustancias antisentido, polipéptidos, etc.) que tienen actividad regulando (inhibición, supresión, activación, estimulación, etc.) la función del “antígeno JTT-1”. Específicamente, dichas sustancias de ensayo se pueden administrar al ratón transgénico para medir y analizar diferentes parámetros fisiológicos, biológicos o farmacológicos generados en el ratón, evaluando así la actividad de las sustancias de ensayo administradas.

35 Además, el ratón silenciado descrito en el presente documento puede aclarar la función de las moléculas de superficie celular descritas en el presente documento, analizando las características del ratón desde diferentes puntos de vista (puntos de vista fisiológico, biológico, farmacológico, patológico y genético).

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico del grupo constituido por:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(b) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;

(c) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de 26 a 625 de SEQ ID NO: 3; y

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de 1 a 140 de SEQ ID NO: 2.

2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, que es un ADNc.

3. Un gen que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1 ó 2.

4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 ó 2, o el gen de la reivindicación 3.

5. Una célula recombinante que comprende el vector de la reivindicación 4.

6. La célula recombinante de la reivindicación 5, que se identifica por el nº de acceso del depósito internacional FERM BP-5725.

7. Un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

8. Un anticuerpo específico para el polipéptido de la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo seleccionado del grupo constituido por anticuerpo de rata, anticuerpo de cobaya, anticuerpo de conejo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo humano.

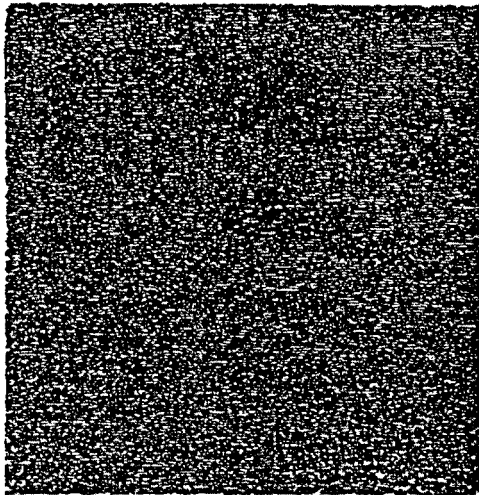
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una parte del anticuerpo monoclonal, en el que la parte se selecciona del grupo constituido por F(ab')₂, Fab' y Fab.

10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 8 ó 9, o una parte del anticuerpo monoclonal definido en la reivindicación 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

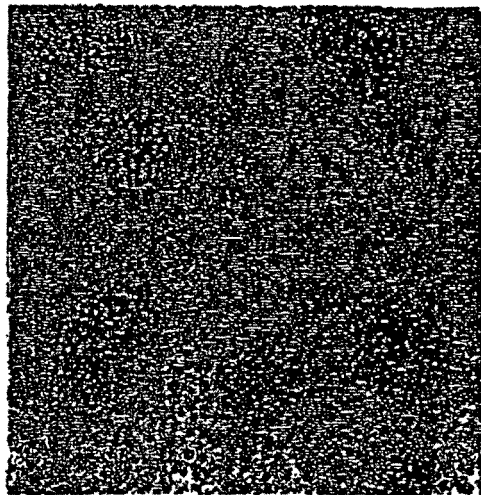
11. Uso del anticuerpo de la reivindicación 8 ó 9, o una parte del anticuerpo monoclonal definido en la reivindicación 9, para preparar una composición farmacéutica para tratar enfermedades inflamatorias o para prevenir dichos síntomas de enfermedad.

12. Una célula que produce anticuerpos que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 9.

Figura 1



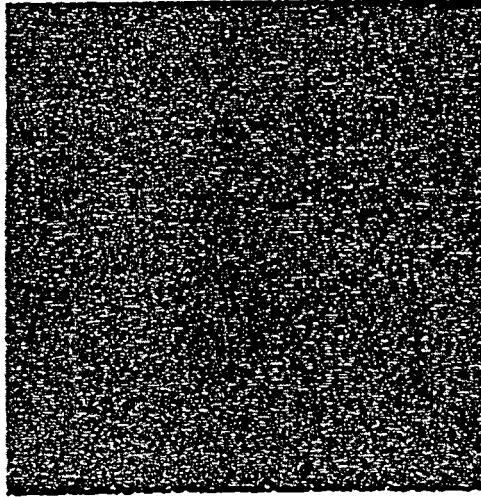
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2

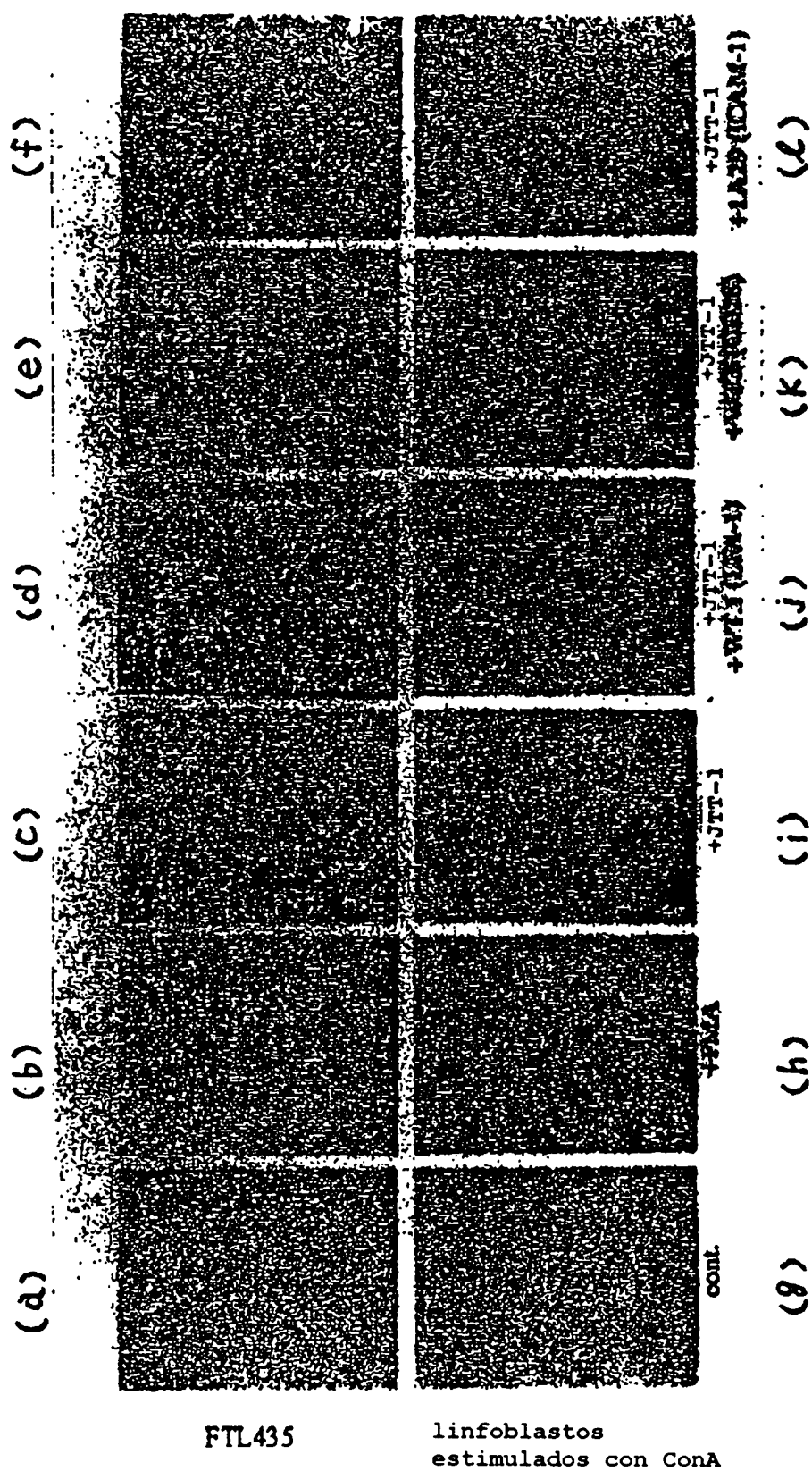


Figura 3

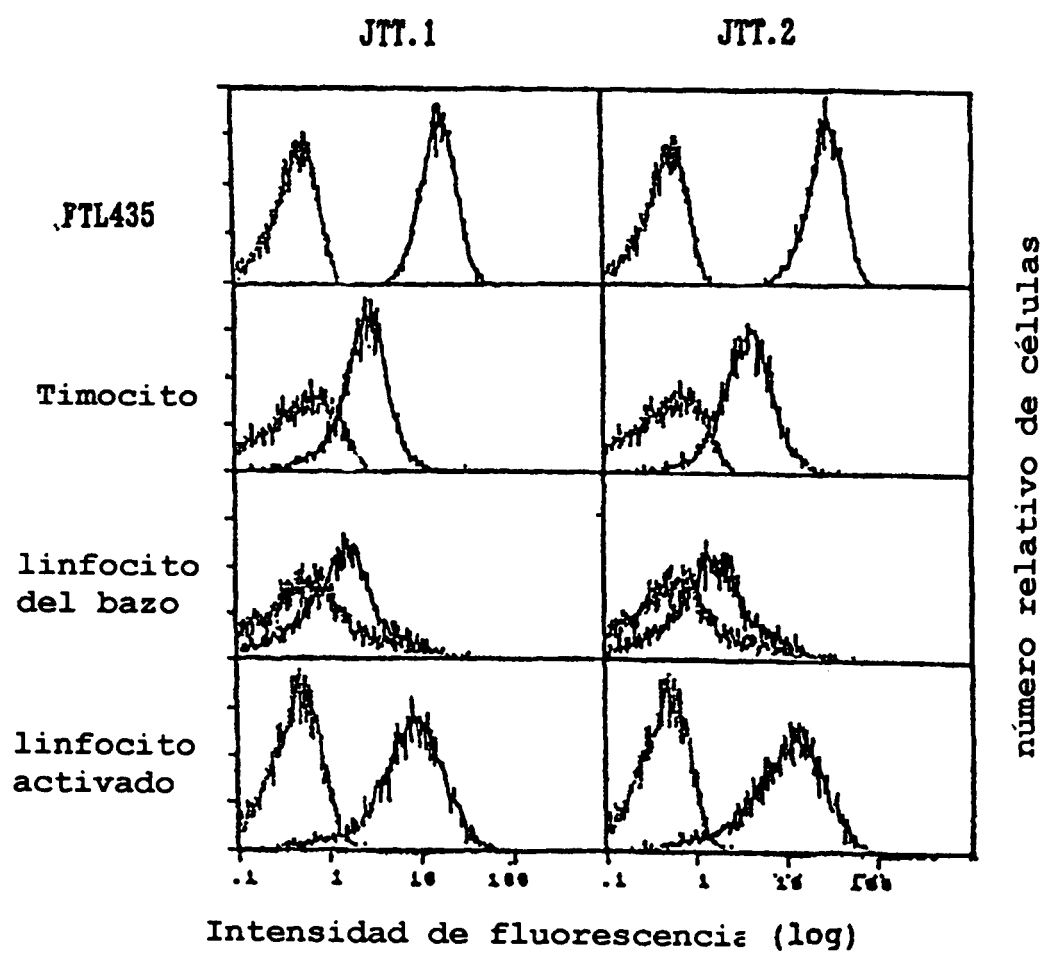


Figura 4

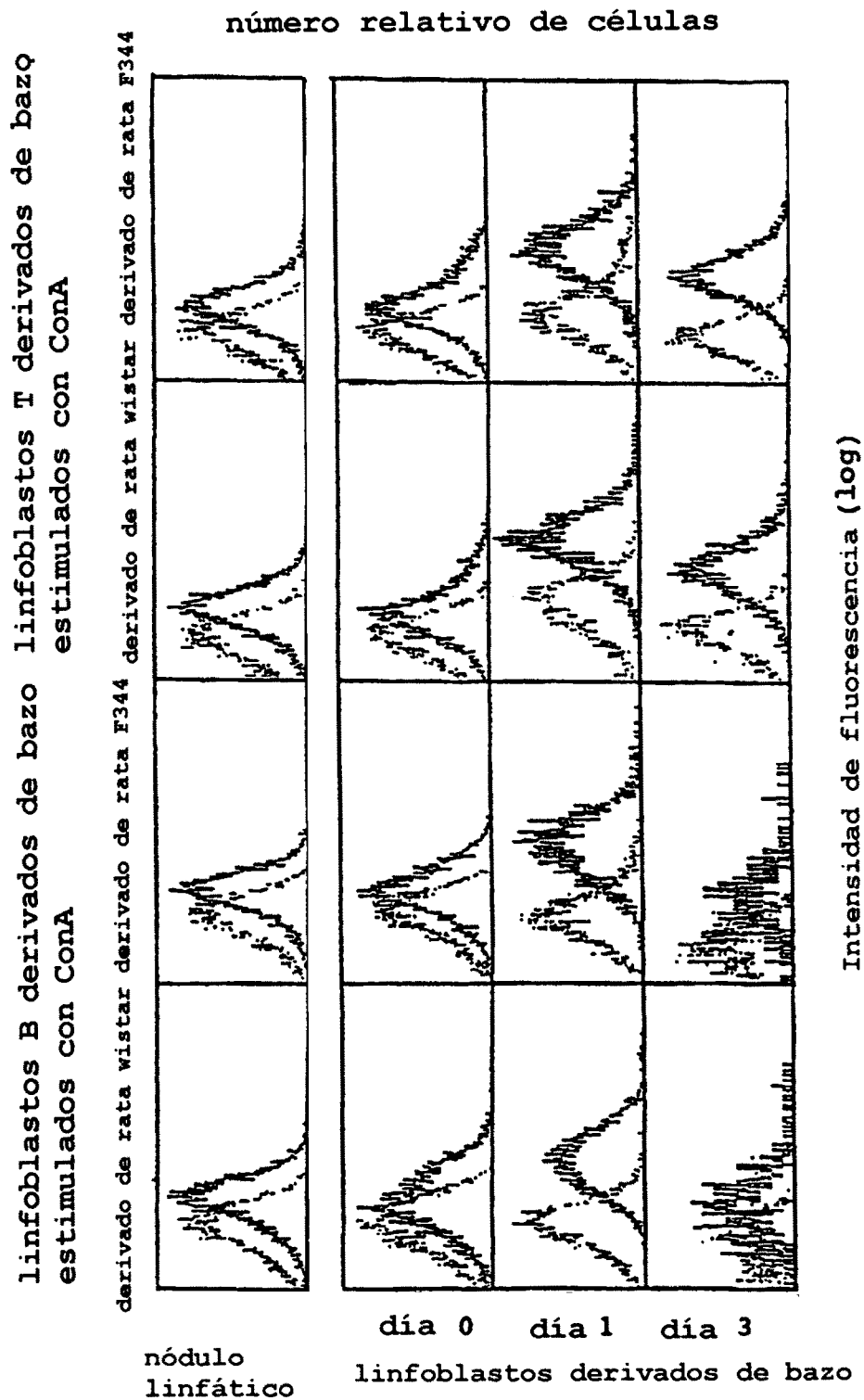


Figura 5

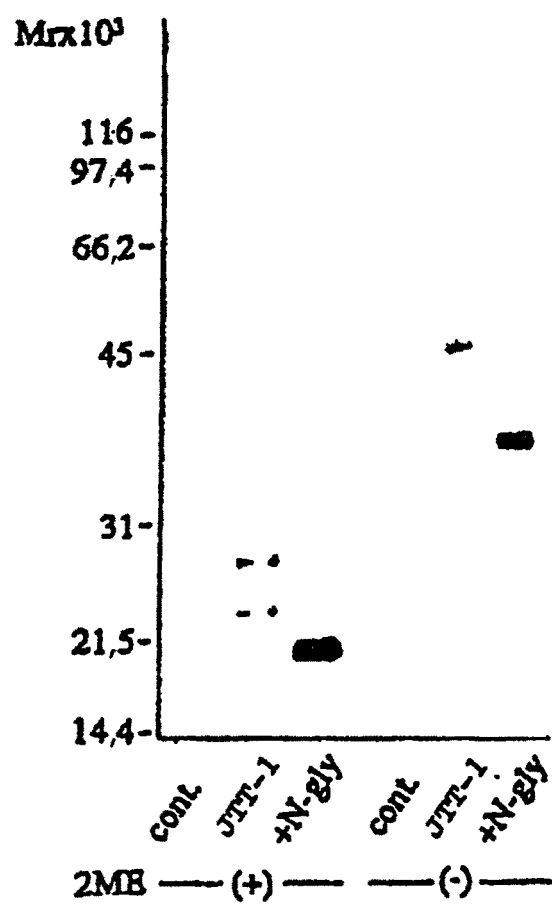
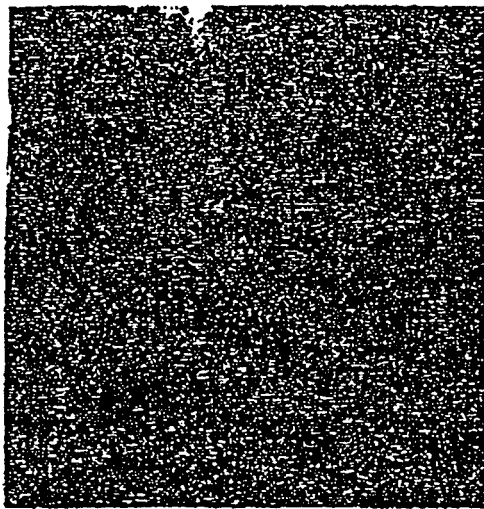
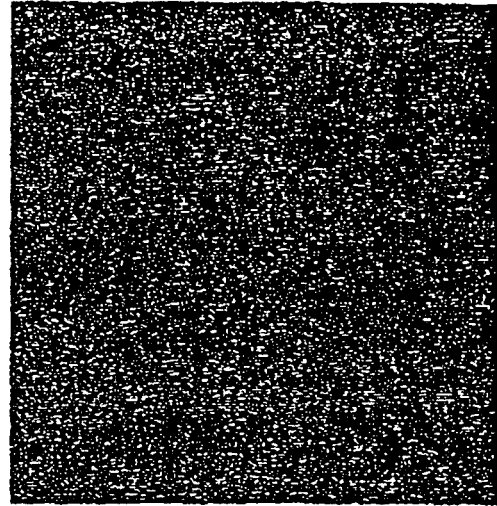


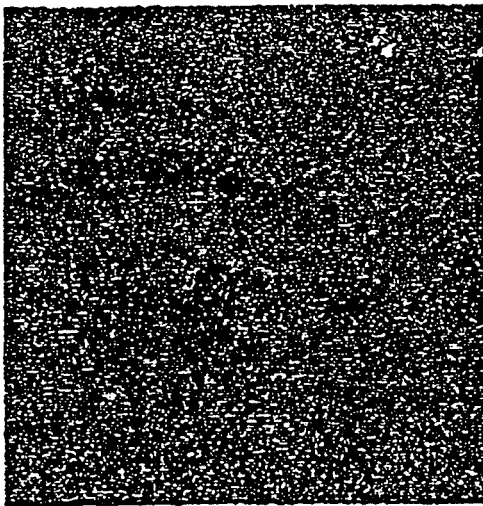
Figura 6



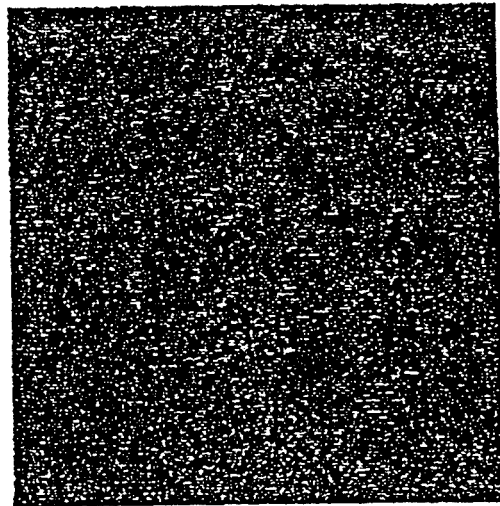
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 7

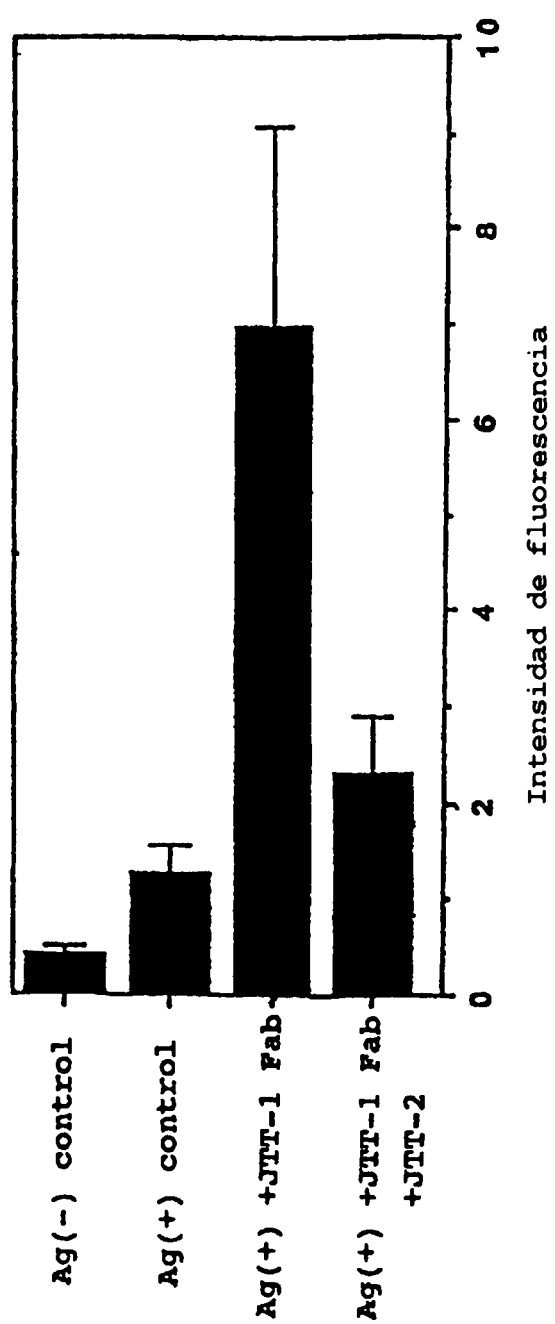


Figura 8

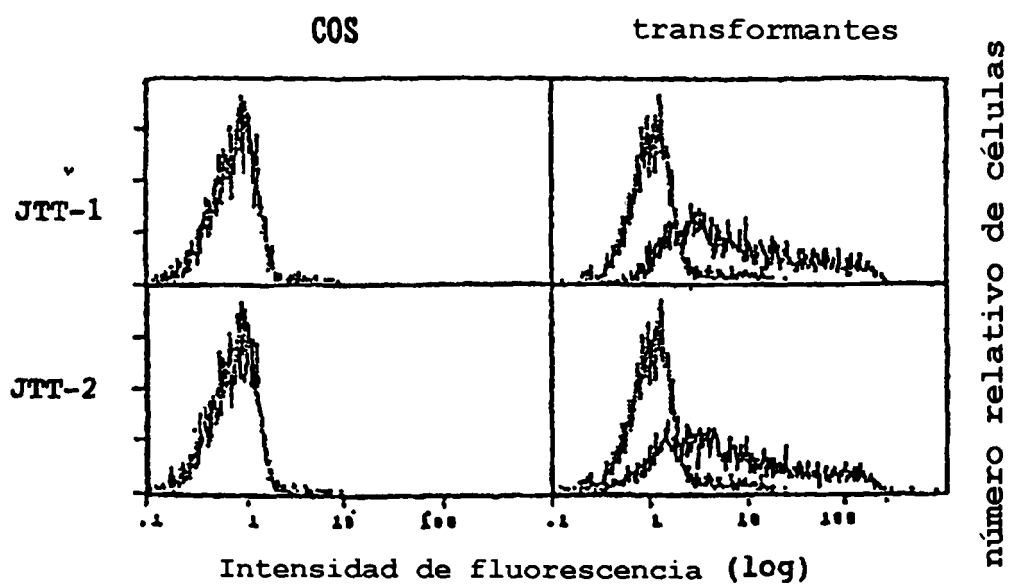


Figura 9

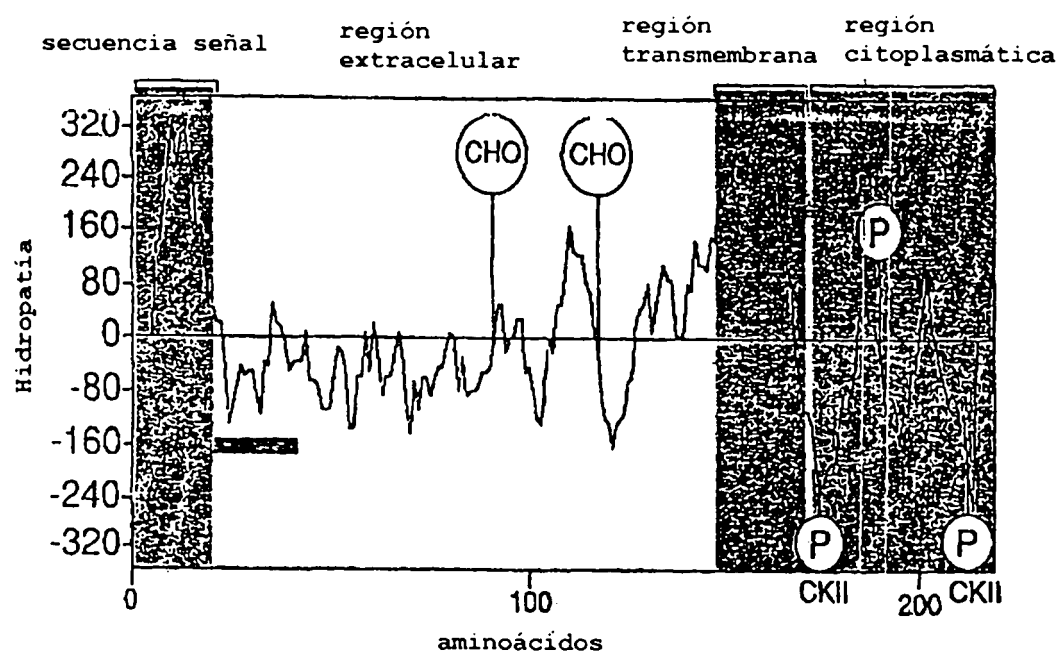


Figura 10

humano	50
rata	50
rata mutante	50
ratón	50
consenso	50
humano	100
rata	100
rata mutante	100
ratón	100
consenso	100
humano	149
rata	150
rata mutante	150
ratón	150
consenso	150
humano	199
rata	200
rata mutante	200
ratón	200
consenso	200
humano	199
rata	200
rata mutante	216
ratón	200
consenso	216

Figura 11

JTT1	M	-	-	-	-	KSGE	-	-	-	-	W	-	YFPFL	PCLRR	IKVLTGEING	SANYEMPI	PH	34
CDS	M	-	-	-	-	RLLA	-	-	-	-	LNLFP	-	FPS	IQVVTGNKILV	XOSPMLVAYD		33	
CTLA4	M	A	C	L	G	P	O	R	H	K	A	Q	L	N	L	A	A	50
consenso	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
JTT1	N	G	G	V	Q	I	L	C	K	Y	-	P	D	I	V	O		78
CDS	N	A	V	-	N	L	S	C	K	Y	-	S	Y	N	L	P		81
CTLA4	N	R	G	I	A	S	P	V	C	E	Y	A	S	P	O	K		98
consenso	N	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	100
JTT1	S	L	K	F	C	H	S	Q	L	S	N	S	V	T	F	Y		126
CDS	T	G	F	N	C	D	G	K	L	G	N	S	V	T	F	Y		131
CTLA4	B	D	S	I	C	T	O	T	S	S	G	N	O	V	N	L		147
consenso	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	150
JTT1	Y	L	H	I	Y	E	S	Q	L	C	C	Q	L	K	F	-		167
CDS	I	I	H	V	K	G	K	H	L	C	C	P	S	P	L	P		181
CTLA4	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C	C	P	D	S	D	F		191
consenso	.	I	H	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	200
JTT1	K	Y	S	S	V	H	D	P	N	G	Z	Y	M	F	M	T		199
CDS	K	R	S	-	-	R	L	L	K	H	S	D	Y	M	N	M		220
CTLA4	K	R	S	-	-	P	L	T	T	G	V	Y	V	K	M	P		223
consenso	K	R	S	-	-	L	:	.	.	.	G	Y	M	.	M	.	.	242

Figura 12

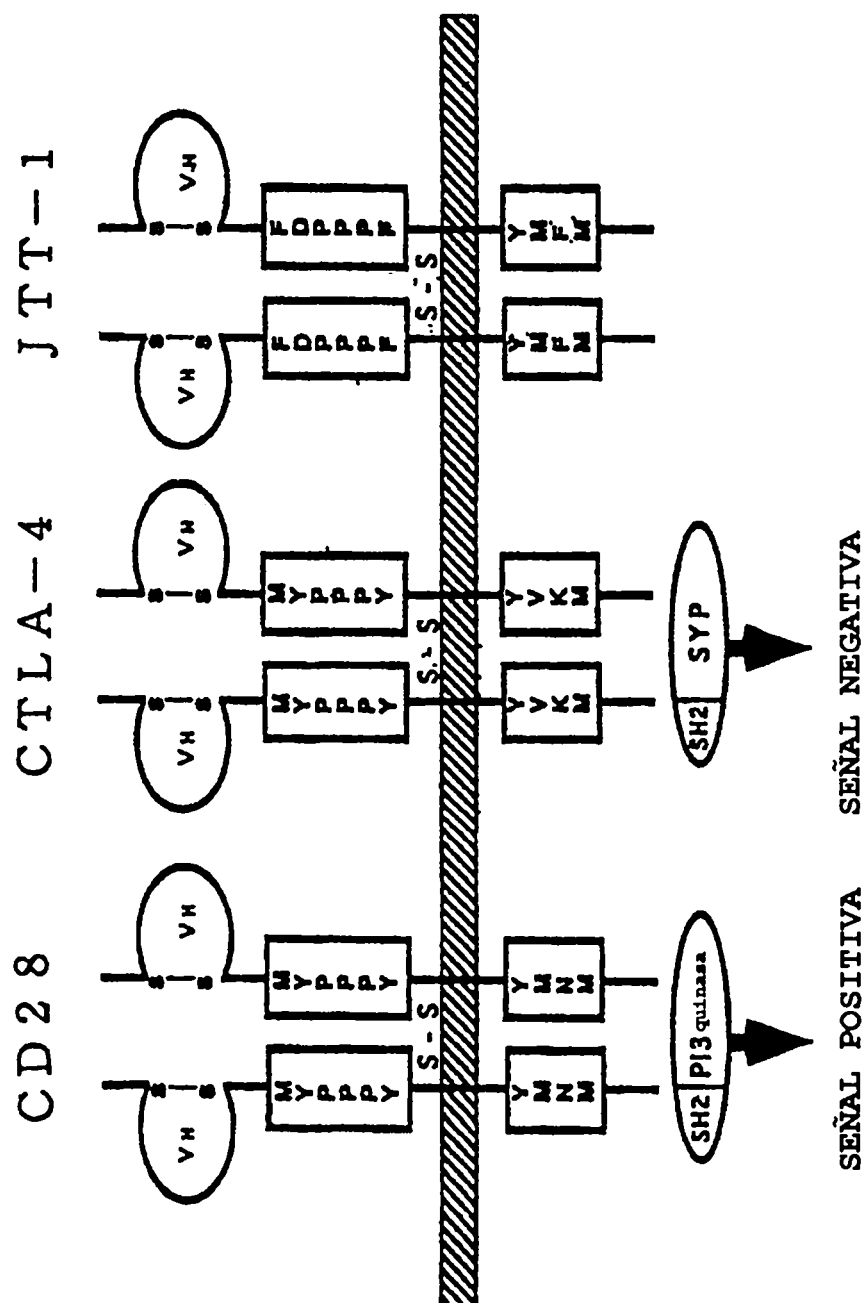


Figura 13

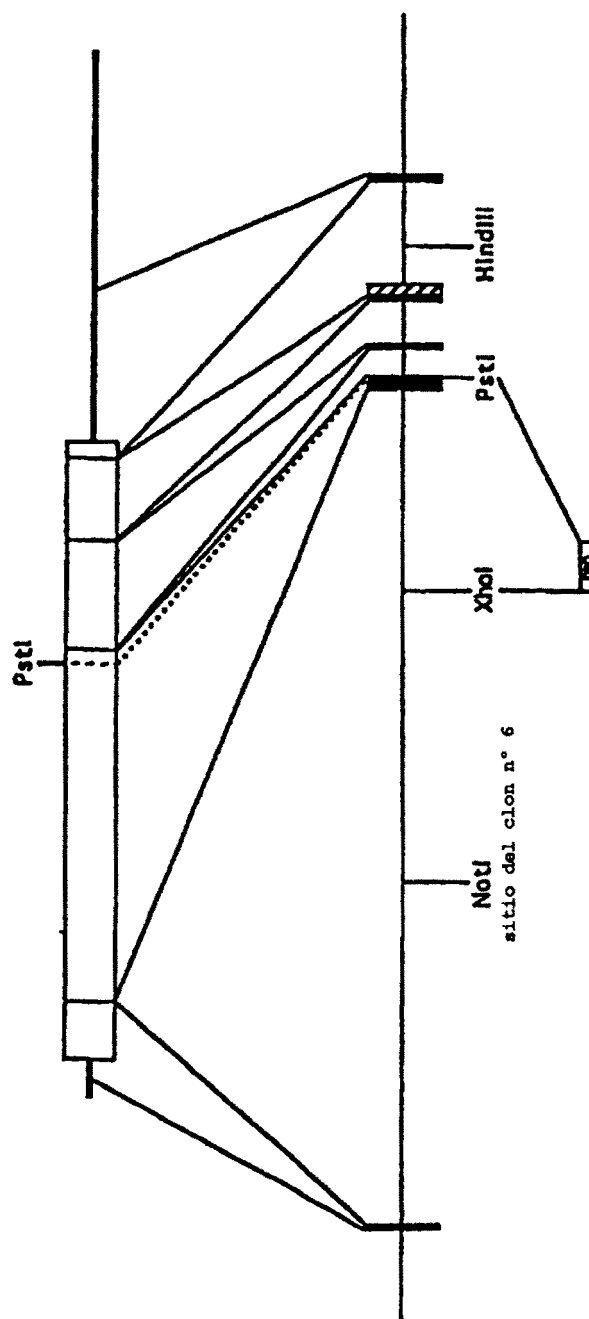


Figura 15

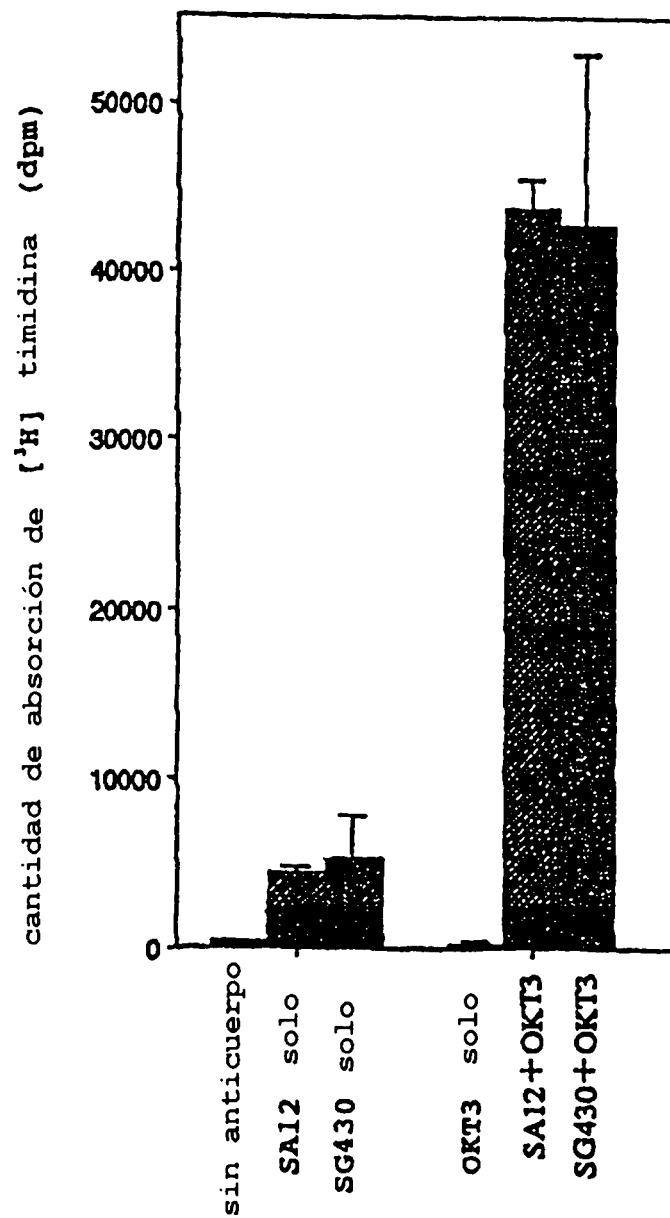


Figura 16

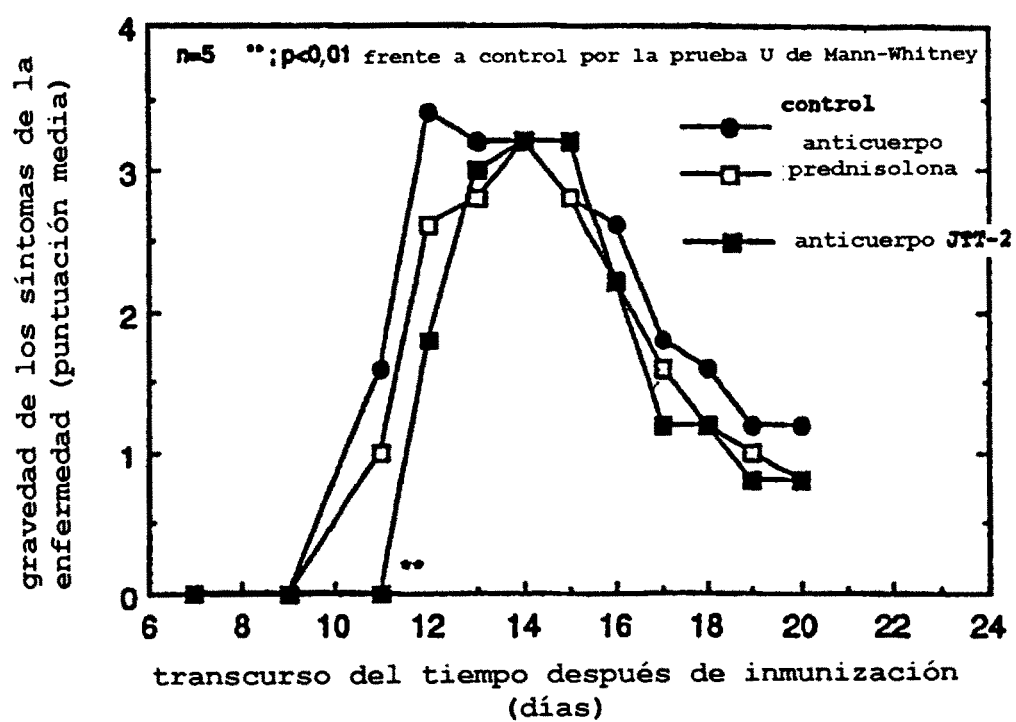


Figura 17

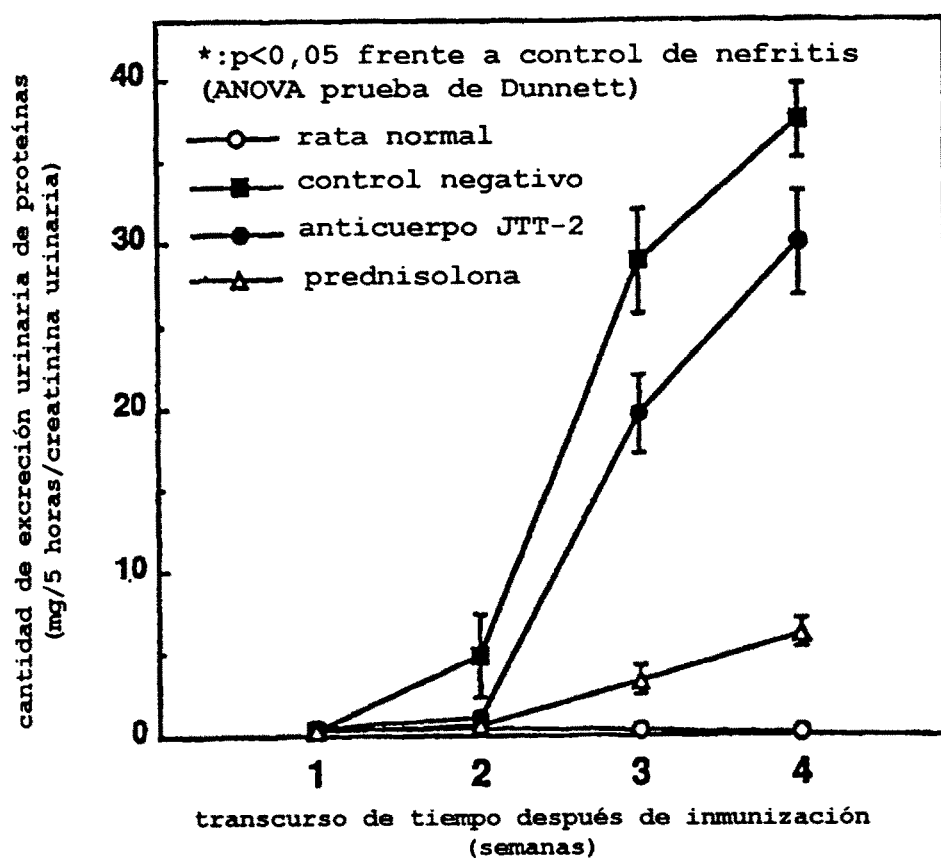


Figura 18

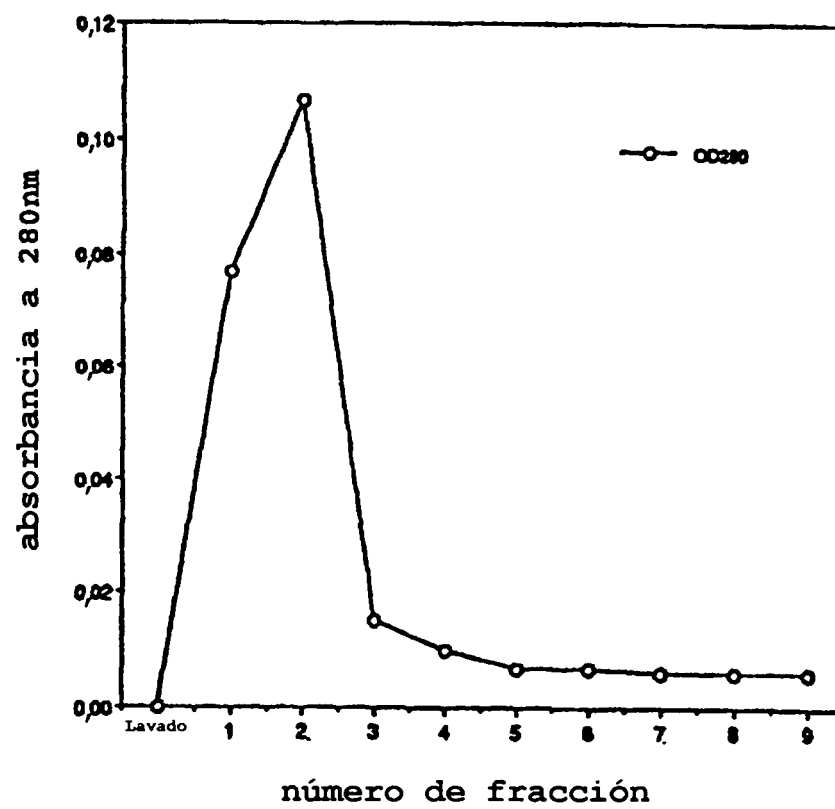


Figura 19

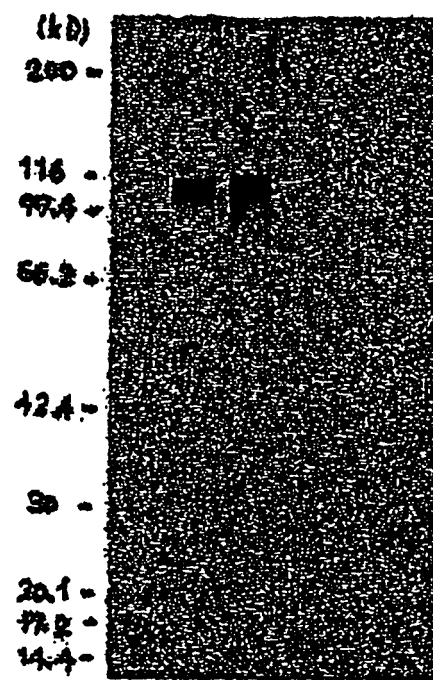


Figura 20

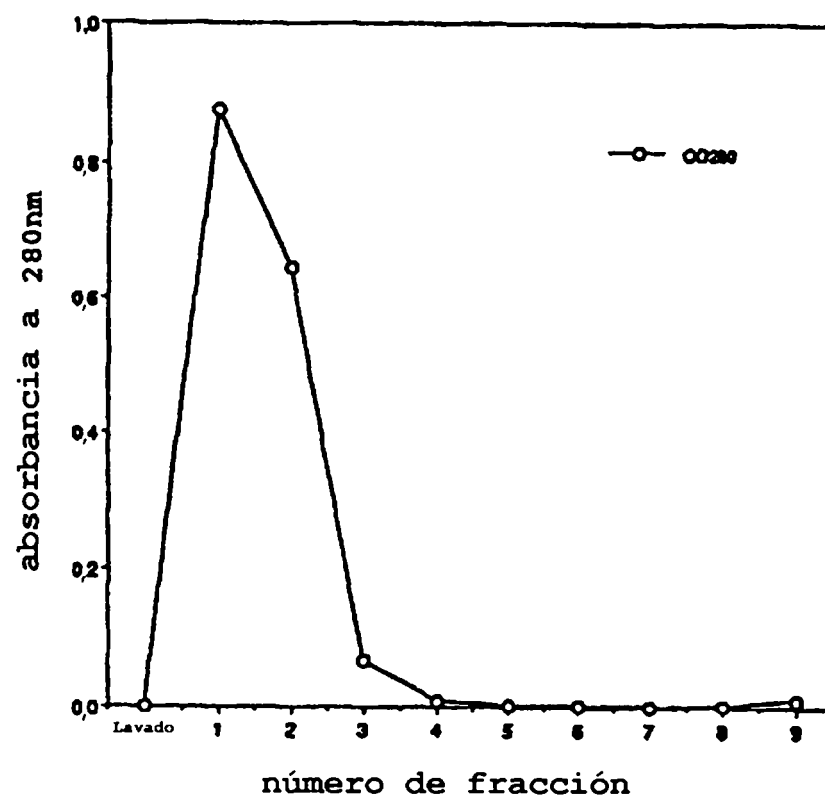


Figura 21

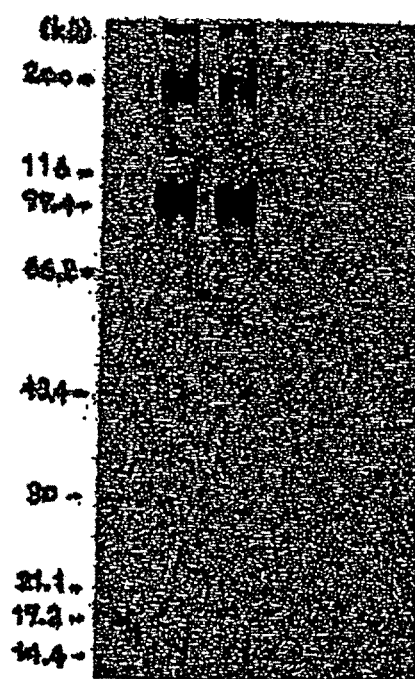
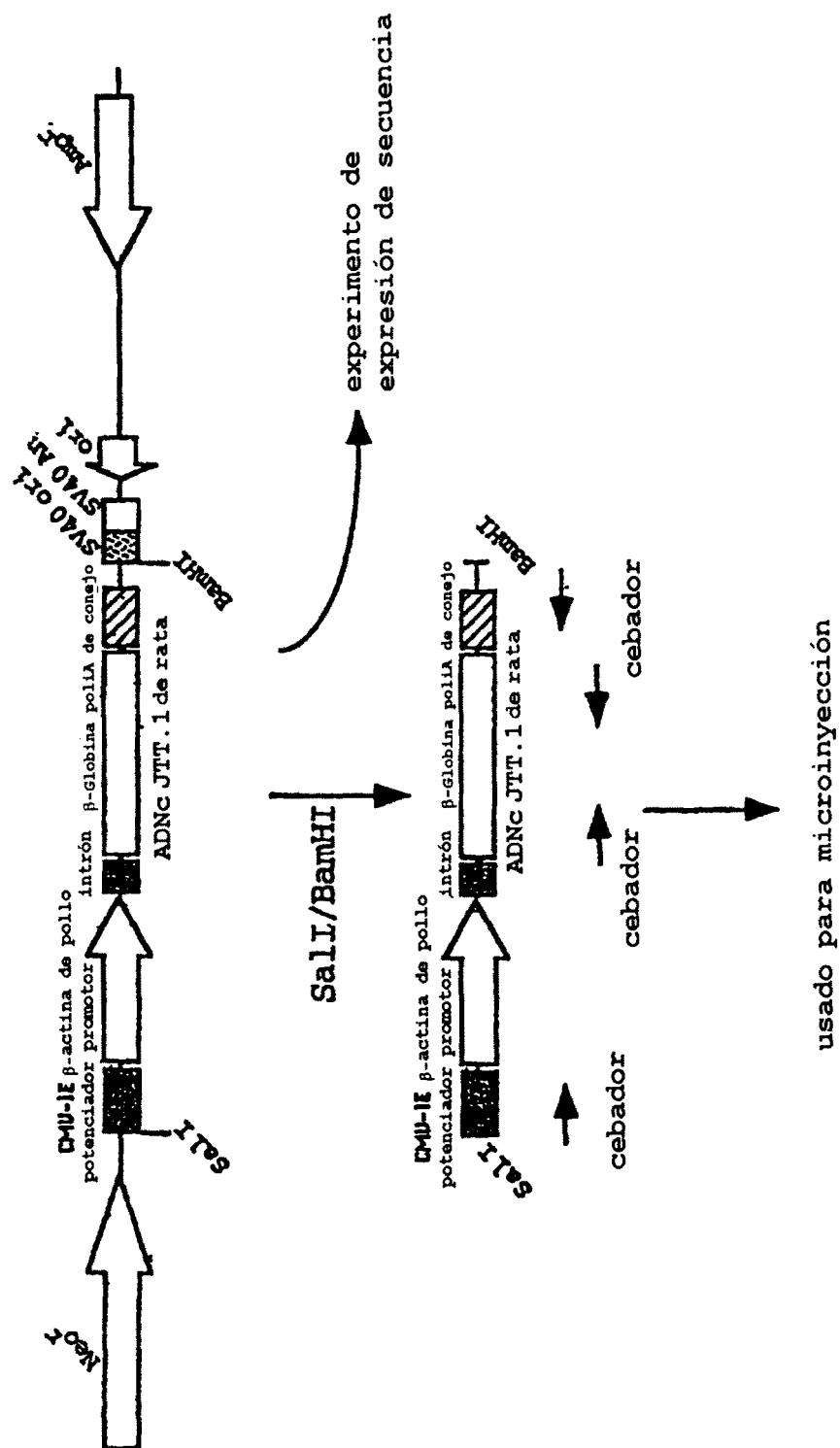


Figura 22



ES 2 285 763 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) Nombre del solicitante: JAPAN TABACCO INC.

5 (2) Título de la invención: Molécula de superficie celular que media la adhesión celular y transmisión de señales

(3) Número de referencia: J1-802PCT

(4) Número de solicitud:

10

(5) Fecha de presentación:

(6) País en el que la solicitud de prioridad se presentó y el número de solicitud de la solicitud:

15

Japón, N° Hei 9-062290

Japón, Solicitud de patente presentada el 26 de febrero, 1998 (número de referencia, J1-802DP1)

(7) Fecha de prioridad: 27 de febrero, 1997

20

(8) Número de secuencias: 12

SEQ ID NO: 1:

25

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 600

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

30

TIPO DE MOLÉCULA: ANDc a ARNm

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Homo sapiens*

CARACTERÍSTICAS:

35

NOMBRE/CLAVE: CDS

SITUACIÓN: 1 .. 600

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

40

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

45

ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC

30

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu

1

5

10

TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA

60

Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly

15

20

GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG

90

55

Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met

25

30

60

65

ES 2 285 763 T3

	TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT	120
	Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
5	35 40	
	TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA	150
	Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln	
10	45 50	
	TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA	180
	Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln	
15	55 60	
	ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA	210
	Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
20	65 70	
	AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG	240
	Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
25	75 80	
	AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC	270
	Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn	
30	85 90	
	AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC	300
	Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp	
35	95 100	
	CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC	330
	His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn	
40	105 110	
	CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA	360
	Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys	
45	115 120	
	GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT	390
	Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile	
50	125 130	
	TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG	420
	Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys	
55	135 140	
	TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT	450
	Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe	
60	145 150	
65		

ES 2 285 763 T3

	GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT	480
5	Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
	155 160	
	ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA	510
10	Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser	
	165 170	
	TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC	540
15	Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr	
	175 180	
	ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA	570
20	Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys	
	185 190	
	AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA	600
25	Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu	
	195	

30 SEQ ID NO: 2:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 199

TIPO DE SECUENCIA: aminoácido

35 TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: proteína

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Homo sapiens*

40

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

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

ES 2 285 763 T3

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

SEQ ID NO: 3:

55	LONGITUD DE LA SECUENCIA: 2610
	TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico
	TOPOLOGÍA: lineal
	TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADNc que contiene secuencias 3' y 5' no traducidas)
60	FUENTE ORIGINAL:
	ORGANISMO: <i>Homo sapiens</i>
	CARACTERÍSTICAS:
	NOMBRE/CLAVE: CDS
65	SITUACIÓN: 26 .. 625
	PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

ES 2 285 763 T3

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3

5	GGACTGTAA CTGTTTCTGG CAAAC	25
	ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC	55
	Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu	
	5 10	
10	TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA	85
	Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly	
	15 20	
15	GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG	115
	Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met	
	25 30	
20	TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT	145
	Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
	35 40	
25	TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA	175
	Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln	
	45 50	
30	TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA	205
	Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln	
	55 60	
35	ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA	235
	Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
	65 70	
40	AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG	265
	Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
	75 80	
45	AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC	295
	Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn	
	85 90	
50	AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC	325
	Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp	
55		
60		
65		

ES 2 285 763 T3

	95	100	
5	CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC	355	
	His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn		
	105	110	
10	CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA	385	
	Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys		
	115	120	
15	GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT	415	
	Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile		
	125	130	
20	TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG	445	
	Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys		
	135	140	
25	TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT	475	
	Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe		
	145	150	
30	GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT	505	
	Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu		
	155	160	
35	ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA	535	
	Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser		
	165	170	
40	TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC	565	
	Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr		
	175	180	
45	ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA	595	
	Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys		
	185	190	
50	AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA	625	
	Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu		
	195		
55	TATGGAAGTC TGGCAGCCAG GCATGAAGCA CGTTGGCCAG TTTTCCTCAA	675	
	CTTGAAGTGC AAGATTCTCT TATTTCCGGG ACCACGGAGA GTCTGACTTA	725	
	ACTACATACA TCTTCTGCTG GTGTTTTGTT CAATCTGGAA GAATGACTGT	775	
60	ATCAGTCAAT GGGGATTTTA ACAGACTGCC TTGGTACTGC CGAGTCCTCT	825	
	CAAAACAAAC ACCCTCTTGC AACCAGCTTT GGAGAAAGCC CAGCTCCTGT	875	

65

ES 2 285 763 T3

5 GTGCTCACTG GGAGTGGAAT CCCTGTCTCC ACATCTGCTC CTAGCAGTGC 925
 ATCAGCCAGT AAAACAAACA CATTTACAAG AAAAATGTTT TAAAGATGCC 975
 AGGGGTACTG AATCTGCAAA GCAAATGAGC AGCCAAGGAC CAGCATCTGT 1025
 CCGCATTTC A CTATCATACT ACCTCTTCTT TCTGTAGGGR TGAGAATTCC 1075
 10 TCTTTTAATC AGTCAAGGGA GATGCTTCAA AGCTGGRGCT ATTTTATTTT 1125
 TGAGATGTTG ATGTGAACTG TACATTAGTA CATACTCAGT ACTCTCCTTC 1175
 AATTGCTGAA CCCCAGTTGA CCATTTTACC AAGACTTTAG ATGCTTTCTT 1225
 15 GTGCCCTCAA TTTTCTTTTT AAAAATACTT CTACATGACT GCTTGACAGC 1275
 CCAACAGCCA CTCTCAATAG AGAGCTATGT CTTACATTCT TTCCTCTGCT 1325
 GCTCAATAGT TTTATATATC TATGCATACA TATATACACA CATATGTATA 1375
 20 TAAATTCAT AATGAATATA TTTGCCTATA TTCTCCCTAC AAGAATATTT 1425
 TTGCTCCAGA AAGACATGTT CTTTTCTCAA ATTCAGTTAA AATGGTTTAC 1475
 TTTGTTC AAG TTAGTGGTAG GAAACATTGC CCGGAATTGA AAGCAAATTT 1525
 25 AWWTTATTAT CCTATTTTCT ACCATTATCT ATGTTTTCAT GGTGCTATTA 1575
 ATTACAAGTT TAGTTCTTTT TGTAAGTCAT ATTA AAAATTG CAAACAAAAT 1625
 CATCTTTAAT GGGCCAGCAT TCTCATGGGG TAGAGCAGAA TATTCATTTA 1675
 30 GCCTGAAAGC TGCAGTTACT ATAGGTTGCT GTCAGACTAT ACCCATGGTG 1725
 CCTCTGGGCT TGACAGGTCA AAATGGTCCC CATCAGCCTG GAGCAGCCCT 1775
 CCAGACCTGG GTGGAATTCC AGGGTTGAGA GACTCCCCTG AGCCAGAGGC 1825
 35 CACTAGGTAT TCTTGCTCCC AGAGGCTGAA GTCACCCTGG GAATCACAGT 1875
 GGTCTACCTG CATT CATAAT TCCAGGATCT GTGAAGAGCA CATATGTGTC 1925
 AGGGCACAAAT TCCCTCTCAT AAAAACCACA CAGCCTGGAA ATTGGCCCTG 1975
 40 GCCCTTCAAG ATAGCCTTCT TTAGAATATG ATTTGGCTAG AAAGATTCTT 2025
 AAATATGTGG AATATGATTA TTCTTAGCTG GAATATTTTC TCTACTTCCT 2075
 GTCTGCATGC CCAAGGCTTC TGAAGCAGCC AATGTCGATG CAACAACATT 2125
 45 TGTAACTTTA GGTAACTGG GATTATGTTG TAGTTTAACA TTTTGTAAC 2175
 GTGTGCTTAT AGTTTACAAG TGAGACCCGA TATGTCATTA TGCATACCTA 2225
 TATTATCTTA AGCATGTGTA ATGCTGGATG TGTACAGTAC AGTACWTAAC 2275
 50 TTGTAATTTG AATCTAGTAT GGTGTTCTGT TTTCAGCTGA CTTGGACAAC 2325
 CTGACTGGCT TTGCACAGGT GTTCCCTGAG TTGTTTG CAG GTTCTGTGT 2375
 GTGGGGTGGG GTATGGGGAG GAGAACCCTC ATGGTGGCCC ACCTGGCCTG 2425
 55 GTTGTC AAG CTGTGCCTCG ACACATCCTC ATCCCAAGCA TGGGACACCT 2475
 CAAGATGAAT AATAATTCAC AAAATTTCTG TGAAATCAA TCCAGTTTTA 2525
 60 AGAGGAGCCA CTTATCAAAG AGATTTTAAAC AGTAGTAAGA AGGCAAAGAA 2575
 TAAACATTTG ATATTCAGCA ACTGAAAAAA AAAAA 2610

ES 2 285 763 T3

SEQ ID NO: 4:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 2072

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADNc que contiene secuencias 3' y 5' no traducidas)

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Rattus*

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: CDS

SITUACIÓN: 35 .. 637

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

CTGGAGGGGA AGAGTGCAGC TGTTCTGGC AGAC	34
ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC	64
Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val	
1 5 10	
TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA	94
Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly	
15 20	
GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG	124
Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met	
25 30	
TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT	154
Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	184
Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA	214
Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA	244
Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAC ACC GTG TCC ATC AAG AAT CCG	274

ES 2 285 763 T3

	Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro	
	75 80	
5	ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC	304
	Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn	
	85 90	
10	AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC	334
	Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp	
	95 100	
15	AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC	364
	Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser	
	105 110	
20	CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA	394
	Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln	
	115 120	
25	GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT	424
	Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu	
	125 130	
30	ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG	454
	Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu	
	135 140	
35	AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT	484
	Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala	
	145 150	
40	TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA	514
	Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
	155 160	
45	TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC	544
	Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr	
	165 170	
50	AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG	574
	Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu	
	175 180	
55	TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC	604
	Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn	
	185 190	
60	AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ATG ACC TCA	634
65		

ES 2 285 763 T3

Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Met Thr Ser

195

200

5	TAA					637
	TCTGGAACAC	GGGAACCCAT	GGAGGAACTA	CACTGTCTAG	TTCCCCTGAA	687
10	ACTTGAATGG	AGAAAGTCTT	CTATTTTCTG	GACCACAGGG	CATCTGACTT	737
	GATTAACCTAC	TGATACCTCC	TTTTGGKGT	TGTTTGTCT	GGATCAGTGA	787
	CTATCAGTCA	CTCGGAATTT	CAGCAGACTG	CCCTGGGTTT	GCTGAGTCCT	837
15	TTTAAGGCAA	ACCCCTTCTT	ATAGAAGACC	CGGCTCATAT	GTATTCAACA	887
	AACAGACCTC	ACTGGGATAC	AATCCCCTCT	TTCTGCGCCT	GCTTCTAGCT	937
	ATGCACCGGC	CAGCAAGACA	AACATATCTC	CAGCATTTTT	ACAAAAATGC	987
20	CAGGGTATGA	ATCTGTAAAG	TACACAGGCA	GCCATTGACC	ACCGTCTGTC	1037
	CTCGTTTTTT	CAGATTCTAT	TTTTTTCCAT	AGAGATCAGC	ATTCTTCTA	1087
	GAATCAGACA	GTAGAGGGAG	ATGCTTCACA	ACAGAAGCTC	TTATGTTTCT	1137
25	GAGATGTTGA	TGAATTCATG	CTTTAGTACC	ACCATGTTCT	CTAACAACTT	1187
	CTATATTCCA	GCTGATCACT	GCTTCAGGGC	TTAGATGCCT	GCTTTTGCCT	1237
	TCAAGTCTCC	CCTTAAAGAT	ACTCCCACAG	GTCTACTTGG	TGGCCTGCAG	1287
30	CCACTCTGAA	TAGGAAGTTT	GGTCTACAAT	TTCCCCCTC	TGCTGCTCAA	1337
	AAAAAAAAAT	TAGTAGATAT	GATTTTCCCA	TATTCTCCCT	GCCAAAGTAA	1387
	TTTTTTCCAG	CAAAGACATC	TAAATTCAGT	TAATATGGTT	TACTGTGTTG	1437
35	ATATTAGTGG	CAGTAAACAT	TTCTCAGAA	CAAAAGCAAA	TTAATTTTGC	1487
	GGTGGTGT	TTCTACCATT	ATCTTGGGTT	TCCATGGTGC	TATTACTCAC	1537
	AAGTTT	AGCT	ATTTT	TTTAT	TTTAT	1587
40	CAACCCTCGG	TTAATGGGCA	AACATTCTCC	TGGGGTAGAA	TGAATTGTCT	1637
	ATTTAGCCCG	AAAAGTGCAG	TTTCTGTGGG	TGGCTGCCAG	ACTACAGCCG	1687
	TGCTTTGCTC	TGGCTTTGAC	AGGTTGAAAT	AGYCCCCATG	ASCSTGGAAC	1737
45	AGWACTCCAG	ACTGTGCTGG	AGTCCCAAAG	TTAGGAGGGC	CATGGAGCCT	1787
	GGGACAGGCT	GCTGCTTTGG	TCTTTAGGAT	CTAGGAARAA	TTACAGAGGG	1837
	GCCAAGACAG	AGTTCCCTCC	CCTAGAAACT	GTGCAGCCTG	GAAGTCAGCC	1887
50	CTGGCACTTT	AAGATAGCCT	TCTTTAGAAC	ATGAGTTAGT	TGGTAGTATT	1937
	CTGACGTGTA	AACAGCCTAT	KGTTGCTCGG	AGCTGGACCA	TTTTCTCCAC	1987
55	TTCCCTGTCT	GCATGCCTAA	GACTTCTAGA	GCAGCCAACG	TATATGCAAC	2037
	ATTAAAGAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAA		2072

ES 2 285 763 T3

SEQ ID NO: 5:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 603

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: ANDc a ARNm

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Mus*

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: CDS

SITUACIÓN: 1 .. 603

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

20	ATG AAG CCG TAC TTC TGC CAT GTC TTT GTC	30
	Met Lys Pro Tyr Phe Cys His Val Phe Val	
	1 5 10	
25	TTC TGC TTC CTA ATC AGA CTT TTA ACA GGA	60
	Phe Cys Phe Leu Ile Arg Leu Leu Thr Gly	
	15 20	
30	GAA ATC AAT GGC TCG GCC GAT CAT AGG ATG	90
	Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met	
	25 30	
35	TTT TCA TTT CAC AAT GGA GGT GTA CAG ATT	120
	Phe Ser Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
	35 40	
40	TCT TGT AAA TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	150
	Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
	45 50	
45	TTA AAA ATG CGA TTG TTC AGA GAG AGA GAA	180
	Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu	
	55 60	
50	GTC CTC TGC GAA CTC ACC AAG ACC AAG GGA	210
	Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
	65 70	
55	AGC GGA AAT GCG GTG TCC ATC AAG AAT CCA	240
	Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro	
	75 80	
60	ATG CTC TGT CTA TAT CAT CTG TCA AAC AAC	270
	Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn	
65	85 90	

ES 2 285 763 T3

	AGC GTC TCT TTT TTC CTA AAC AAC CCA GAC	300
5	Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp	
	95 100	
	AGC TCC CAG GGA AGC TAT TAC TTC TGC AGC	330
10	Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser	
	105 110	
	CTG TCC ATT TTT GAC CCA CCT CCT TTT CAA	360
15	Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln	
	115 120	
	GAA AGG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CAT	390
20	Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His	
	125 130	
	ATT TAT GAA TCC CAG CTC TGC TGC CAG CTG	420
25	Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu	
	135 140	
	AAG CTC TGG CTA CCC GTA GGG TTG CCA GCT	450
30	Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Leu Pro Ala	
	145 150	
	TTC GTT GTG GTA CTC CTT TTT GGA TGC ATA	480
35	Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
	155 160	
	CTT ATC ATC TGG TTT TCA AAA AAG AAA TAC	510
40	Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr	
	165 170	
	GGA TCC AGT GTG CAT GAC CCT AAT AGT GAA	540
45	Gly Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu	
	175 180	
	TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC	570
50	Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn	
	185 190	
	AAA AAG TCT AGA CTT GCA GGT GTG ACC TCA	600
55	Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser	
	195 200	
60	TAA	603

65

ES 2 285 763 T3

SEQ ID NO: 6:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 836

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADNc que contiene secuencias 3' y 5' no traducidas)

FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: *Rattus*

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: CDS

SITUACIÓN: 35 .. 685

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

CTGGAGGGGA AGAGTGCAGC TGTCCTGGC AGAC 34

ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC 64

Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val

1 5 10

TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA 94

Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly

15 20

GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG 124

Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met

25 30

TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT 154

Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile

35 40

TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG 184

Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln

45 50

TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA 214

Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Gln

55 60

CTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA 244

Val Lou Gys Asp Lou The Lus The Lus Clr

6E 70

09 10
AGG CCA AAC AGC CTC TCC ATC AAC AAT CCC

See Clx Apr Ths Vol Sep Ho Jan Aug Dec

ES 2 285 763 T3

		75		80	
		ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC			304
5		Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn			
		85		90	
		AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC			334
10		Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp			
		95		100	
		AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC			364
15		Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser			
		105		110	
		CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA			394
20		Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln			
		115		120	
		GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT			424
25		Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu			
		125		130	
		ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG			454
30		Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu			
		135		140	
		AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT			484
35		Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala			
		145		150	
		TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA			514
40		Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile			
		155		160	
		TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC			544
45		Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr			
		165		170	
		AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG			574
50		Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu			
		175		180	
		TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC			604
55		Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn			
		185		190	
		AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ACA GCA CCC			634
60		Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Thr Ala Pro			

65

ES 2 285 763 T3

	195	200	
	CTT AGG GCT TTG GGG AGA GGA GAA CAC TCT		664
5	Leu Arg Ala Leu Gly Arg Gly Glu His Ser		
	205	210	
	TCA TGT CAA GAC CGG AAT TAA		685
10	Ser Cys Gln Asp Arg Asn		
	215		
	TTTGTTTATT TCTATTTTAA AAGAAAGACA TTTTTCCTCC TAAAGATAAT		735
15	TTTTGTATTT TTATGTGAAA GTCTGAATCT TCATTTTAAAC TCGACTTATA		785
	TACTCTGTGG TATATTAAAA ATAATGTTTG TGAACAAAAA AAAAAAAA		835
20	A		836

SEQ ID NO: 7:

	LONGITUD DE LA SECUENCIA: 27
	TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico
	TOPOLOGÍA: lineal
30	TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)
	CARACTERÍSTICAS:
	NOMBRE/CLAVE: unión de cebador
	SITUACIÓN: 1 .. 27
35	PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7

	CTGCTCGAGA TGAAGCCCTA CTTCTCG		27
--	-------------------------------	--	----

SEQ ID NO: 8:

	LONGITUD DE LA SECUENCIA: 32
	TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico
	TOPOLOGÍA: lineal
	TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)
	CARACTERÍSTICAS:
50	NOMBRE/CLAVE: unión de cebador
	SITUACIÓN: 1 .. 32
	PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

55 DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8

	ACCCATACGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC AA		32
--	--------------------------------------	--	----

60 SEQ ID NO: 9:

	LONGITUD DE LA SECUENCIA: 30
	TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico
	TOPOLOGÍA: lineal
65	TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)

ES 2 285 763 T3

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: unión de cebador

SITUACIÓN: 1 .. 30

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9

TAAGTGTTC TCGAGAACAT GAAGTCAGGC

SEQ ID NO: 10:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 30

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: unión de cebador

SITUACIÓN: 1 .. 30

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10

ATCCTATGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC

SEQ ID NO: 11:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 35

DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: unión de cebador

SITUACIÓN: 1 .. 35

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11

CGTGATATTG CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGC

SEQ ID NO: 12:

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 34

TIPO DE SECUENCIA: ácido nucleico

TOPOLOGÍA: lineal

TIPO DE MOLÉCULA: otros ácido nucleicos (ADN sintético)

CARACTERÍSTICAS:

NOMBRE/CLAVE: unión de cebador

SITUACIÓN: 1 .. 34

PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN: E

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12

CATTCAAGTT TCAGGGAAGT AGTCCATGCG TTTC

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JAPAN TOBACCO INC.
5 <120> Molécula de superficie celular que media la adhesión celular y transmisión de señales
<130> J1-802PCT-EP
<140> EP 98905708.8
<141> 1998-02-27
10 <150> JP 1997-62290
<151> 1997-02-27
<150> JP 1998-62217
15 <151> 1998-02-26
<160> 12
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
20 <211> 600
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
25 <220>
<221> CDS
<222> (1) .. (600)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 285 763 T3

<400> 1

5	atg aag tca ggc ctc tgg tat ttc ttt ctc ttc tgc ttg cgc att aaa	48
	Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys	
	1 5 10 15	
10	gtt tta aca gga gaa atc aat ggt tct gcc aat tat gag atg ttt ata	96
	Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile	
	20 25 30	
15	ttt cac aac gga ggt gta caa att tta tgc aaa tat cct gac att gtc	144
	Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val	
	35 40 45	
20	cag caa ttt aaa atg cag ttg ctg aaa ggg ggg caa ata ctc tgc gat	192
	Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp	
	50 55 60	
25	ctc act aag aca aaa gga agt gga aac aca gtg tcc att aag agt ctg	240
	Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
	65 70 75 80	
30	aaa ttc tgc cat tct cag tta tcc aac aac agt gtc tct ttt ttt cta	288
	Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu	
	85 90 95	
35	tac aac ttg gac cat tct cat gcc aac tat tac ttc tgc aac cta tca	336
	Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser	
	100 105 110	
40	att ttt gat cct cct cct ttt aaa gta act ctt aca gga gga tat ttg	384
	Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu	
	115 120 125	
45	cat att tat gaa tca caa ctt tgt tgc cag ctg aag ttc tgg tta ccc	432
	His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro	
	130 135 140	
50	ata gga tgt gca gcc ttt gtt gta gtc tgc att ttg gga tgc ata ctt	480
	Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
	145 150 155 160	
55	att tgt tgg ctt aca aaa aag aag tat tca tcc agt gtg cac gac cct	528
	Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro	
	165 170 175	
60	aac ggt gaa tac atg ttc atg aga gca gtg aac aca gcc aaa aaa tct	576
	Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser	
	180 185 190	
65	aga ctc aca gat gtg acc cta taa	600
	Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu	
	195	

<210> 2

<211> 199

<212> FRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 285 763 T3

<400> 2

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

<210> 3

<211> 2610

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(625)

ES 2 285 763 T3

<400> 3

```

5      ggactgttaa ctgtttctgg caaac atg aag tca ggc ctc tgg tat ttc ttt 52
      Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe
      1 5

10     ctc ttc tgc ttg cgc att aaa gtt tta aca gga gaa atc aat ggt tct 100
      Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser
      10 15 20 25

15     gcc aat tat gag atg ttt ata ttt cac aac gga ggt gta caa att tta 148
      Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu
      30 35 40

20     tgc aaa tat cct gac att gtc cag caa ttt aaa atg cag ttg ctg aaa 196
      Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys
      45 50 55

25     ggg ggg caa ata ctc tgc gat ctc act aag aca aaa gga agt gga aac 244
      Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn
      60 65 70

30     aca gtg tcc att aag agt ctg aaa ttc tgc cat tct cag tta tcc aac 292
      Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn
      75 80 85

35     aac agt gtc tct ttt ttt cta tac aac ttg gac cat tct cat gcc aac 340
      Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn
      90 95 100 105

40     tat tac ttc tgc aac cta tca att ttt gat cct cct cct ttt aaa gta 388
      Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val
      110 115 120

45     act ctt aca gga gga tat ttg cat att tat gaa tca caa ctt tgt tgc 436
      Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys
      125 130 135

50     cag ctg aag ttc tgg tta ccc ata gga tgt gca gcc ttt gtt gta gtc 484
      Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val
      140 145 150

55     tgc att ttg gga tgc ata ctt att tgt tgg ctt aca aaa aag aag tat 532
      Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr
      155 160 165

60     tca tcc agt gtg cac gac cct aac ggt gaa tac atg ttc atg aga gca 580
      Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala
      170 175 180 185

65     gtg aac aca gcc aaa aaa tct aga ctc aca gat gtg acc cta taa 625
      Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
      190 195

      tatggaactc tggcaccag gcatgaagca cgttggccag ttttcctcaa cttgaagtgc 685
      aagattctct tatttcggg accacggaga gtctgactta actacatata tttctgctg 745
      gtgttttggt caatctggaa gaatgactgt atcagtcaat ggggatttta acgactgcc 805
      ttggtactgc cgagtcctct caaaacaaac accctcttgc aaccagcttt ggagaaagcc 865

```

ES 2 285 763 T3

cagctcctgt gtgctcactg ggagtggaat ccctgtctcc acatctgctc ctagcagtgc 925
 atcagccagt aaaacaaaca catttacaag aaaaatgttt taaagatgcc aggggtactg 985
 5 aatctgcaaa gcaaattgagc agccaaggac cagcatctgt ccgcatttca ctatcatact 1045
 acctcttctt tctgtagggr tgagaattcc tcttttaatc agtcaaggga gatgcttcaa 1105
 10 agctggrgct attttatttc tgagatgttg atgtgaactg tacattagta catactcagt 1165
 actctccttc aattgctgaa cccagttga ccattttacc aagacttttag atgctttctt 1225
 gtgcccctcaa ttttcttttt aaaaatactt ctacatgact gcttgacagc ccaacagcca 1285
 15 ctctcaatag agagctatgt cttacattct ttcctctgct gctcaatagt tttatatatc 1345
 tatgcataca tatatacaca catatgtata taaaattcat aatgaatata tttgcctata 1405
 20 ttctccctac aagaatattt ttgctccaga aagacatgtt cttttctcaa attcagttaa 1465
 aatggtttac tttgttcaag ttagtggttag gaaacattgc ccggaattga aagcaaattt 1525
 awwtattat cctattttct accattatct atgttttcat ggtgctatta attacaagtt 1585
 25 tagttctttt tgtagatcat attaaaattg caaacaaaat catctttaat gggccagcat 1645
 tctcatgggg tagagcagaa tattcattta gcctgaaagc tgcaagtact ataggttgct 1705
 30 gtcagactat acccatgggtg cctctgggct tgacaggcca aaatgggtccc catcagcctg 1765
 gagcagccct ccagacctgg gtggaattcc agggttgaga gactcccctg agccagaggc 1825
 cactaggtat tcttgcctcc agaggctgaa gtcacctgg gaatcacagt ggtctacctg 1885
 35 cattcataat tccaggatct gtgaagagca catatgtgtc agggcacaat tccctctcat 1945
 aaaaaccaca cagcctggaa attggccctg gcccttcaag atagccttct ttagaatatg 2005
 40 atttggctag aaagattctt aaatatgttg aatatgatta ttcttagctg gaatattttc 2065
 tctacttctt gtctgcatgc ccaaggcttc tgaagcagcc aatgtcgatg caacaacatt 2125
 45 tgtaacttta ggtaaaactgg gattatgttg tagtttaaca ttttgtaact gtgtgcttat 2185
 agtttacaag tgagaccoga tatgtcatta tgcatactta tattatctta agcatgtgta 2245
 atgctggatg tgtacagtac agtacwtaac ttgtaatttg aatctagtat ggtgttctgt 2305
 50 tttcagctga cttggacaac ctgactggct ttgcacaggt gttccctgag ttgtttgcag 2365
 gtttctgtgt gtgggggtggg gtatggggag gagaaccttc atggtggccc acctggcctg 2425
 55 gttgtccaag ctgtgcctcg acacatcttc atcccaagca tgggacacct caagatgaat 2485
 aataattcac aaaaattctg tgaaatcaaa tccagtttta agaggagcca cttatcaaag 2545
 60 agattttaac agtagtaaga aggcaaagaa taaacatttg atattcagca actgaaaaaa 2605
 aaaaa 2610

<210> 4

65 <211> 2072

<212> ADN

ES 2 285 763 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> CDS

5 <222> (35).. (637)

<400> 4

```

10      ctggagggga agagtgcagc tgttcctggc agac atg aag ccc tac ttc tcg tgc 55
                                         Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys
                                           1           5

15      gtc ttt gtc ttc tgc ttc cta atc aaa ctt tta aca gga gaa ctc aat 103
      Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Asn
                10                15                20

20      gac ttg gcc aat cac agg atg ttt tcg ttt cac gat gga ggt gta cag 151
      Asp Leu Ala Asn His Arg Met Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln
                25                30                35

25      att tct tgt aac tac cct gag act gtc cag cag tta aaa atg cag ttg 199
      Ile Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys Met Gln Leu
                40                45                50                55

30      ttc aaa gac aga gaa gtc ctc tgc gac ctc acc aag acc aag gga agc 247
      Phe Lys Asp Arg Glu Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser
                60                65                70

35      gga aac acc gtg tcc atc aag aat ccg atg tcc tgt cca tat cag ctg 295
      Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu
                75                80                85

40      tcc aac aac agt gtc tct ttt ttc cta gac aac gca gac agc tcc cag 343
      Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp Ser Ser Gln
                90                95                100

45      ggc agc tac ttt tta tgc agc ctg tcg att ttc gac cca ccc cct ttt 391
      Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe
                105                110                115

50      caa gaa aag aac ctt agt gga gga tat ttg ctt att tat gaa tcc cag 439
      Gln Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu Ile Tyr Glu Ser Gln
                120                125                130                135

55      ctt tgt tgc cag ctg aag ctt tgg tta ccc gta ggg tgt gca gct ttt 487
      Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe
                140                145                150

60      gtg gca gcg ctc ctt ttt gga tgc ata ttt atc gtc tgg ttt gca aaa 535
      Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys
                155                160                165

65      aag aag tac aga tcc agt gtg cac gac cct aat agc gag tac atg ttc 583
      Lys Lys Tyr Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe
                170                175                180

70      atg gcg gca gtc aac aca aac aaa aag tcc aga ctt gca ggt atg acc 631
      Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Met Thr
                185                190                195

75      tca taa tctggaacac gggaacccat ggaggaacta cactgtctag ttcccctgaa 687
      Ser

```

ES 2 285 763 T3

200

5 acttgaatgg agaaagtctt ctattttctg gaccacaggg catctgactt gattaactac 747
 tgatacctcc ttttgkggtt ttgtttgtct ggatcagtga ctatcagtca ctcggaattt 807
 cagcagactg ccctgggttt gctgagtcct ttttaaggcaa accccttctt atagaagacc 867
 10 cggctcatat gtattcaaca aacagacctc actgggatac aatcccctct ttctgcgcct 927
 gcttctagct atgcaccggc cagcaagaca aacatatctc cagcattttt acaaaaatgc 987
 15 cagggatga atctgtaaag tacacaggca gccattgacc accgtctgtc ctcgtttttt 1047
 cagattctat ttttttccat agagatcagc attccttcta gaatcagaca gtagagggag 1107
 atgcttcaca acagaagctc ttatgtttct gagatgttga tgaattcatg ctttagtacc 1167
 20 accatgttct ctaacaactt ctatattcca gctgatcact gcttcagggc ttagatgcct 1227
 gcttttgcct tcaagtctcc ccttaaagat actcccacag gtctacttgg tggcctgcag 1287
 25 ccactctgaa taggaagttt ggtctacaat ttccccctc tgctgctcaa aaaaaaaaaat 1347
 tagtagatat gattttccca tattctccct gccaaagtaa ttttttccag caaagacatc 1407
 taaattcagt taatatggtt tactgtgttg atattagtgg cagtaaacad ttctcagaat 1467
 30 caaaagcaaa ttaattttgc ggtggtgttt ttctaccatt atcttgggtt tccatggtgc 1527
 tattactcac aagtttagct atttttttat gcatcatatt aaagttgcaa gcaagcagag 1587
 35 caaccctcgg ttaatgggca aacattctcc tggggtagaa tgaattgtct atttagcccg 1647
 aaaactgcag tttctgtggg tggctgccag actacagccg tgctttgtc tggctttgac 1707
 aggttgaaat agycccatg ascstggaac agwactccag actgtgctgg agtcccaaag 1767
 40 ttaggagggc catggagcct gggacaggct gctgcttttg tctttaggat ctaggaaraa 1827
 ttacagaggg gccaaagacag agttccctcc cctagaaact gtgcagcctg gaagtcagcc 1887
 45 ctggcacttt aagatagcct tctttagaac atgagttagt tggtagtatt ctgacgtgta 1947
 aacagcctat kgttgctcgg agctggacca ttttctccac ttccctgtct gcatgcctaa 2007
 50 gactttctaga gcagccaacg tatatgcaac attaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2067
 aaaaaa 2072

55 <210> 5
 <211> 603
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (603)

65

ES 2 285 763 T3

<400> 5

atg aag ccg tac ttc tgc cat gtc ttt gtc ttc tgc ttc cta atc aga 48
Met Lys Pro Tyr Phe Cys His Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Arg

5

1 5 10 15

10

ctt tta aca gga gaa atc aat ggc tgc gcc gat cat agg atg ttt tca 96
Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met Phe Ser
20 25 30

15

ttt cac aat gga ggt gta cag att tct tgt aaa tac cct gag act gtc 144
Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val
35 40 45

20

cag cag tta aaa atg cga ttg ttc aga gag aga gaa gtc ctc tgc gaa 192
Gln Gln Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu Val Leu Cys Glu
50 55 60

25

ctc acc aag acc aag gga agc gga aat gcg gtg tcc atc aag aat cca 240
Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro
65 70 75 80

30

atg ctc tgt cta tat cat ctg tca aac aac agc gtc tct ttt ttc cta 288
Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

35

aac aac cca gac agc tcc cag gga agc tat tac ttc tgc agc ctg tcc 336
Asn Asn Pro Asp Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser Leu Ser
100 105 110

40

att ttt gac cca cct cct ttt caa gaa agg aac ctt agt gga gga tat 384
Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr
115 120 125

45

ttg cat att tat gaa tcc cag ctc tgc tgc cag ctg aag ctc tgg cta 432
Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu
130 135 140

50

ccc gta ggg ttg cca gct ttc gtt gtg gta ctc ctt ttt gga tgc ata 480
Pro Val Gly Leu Pro Ala Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile
145 150 155 160

55

ctt atc atc tgg ttt tca aaa aag aaa tac gga tcc agt gtg cat gac 528
Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr Gly Ser Ser Val His Asp
165 170 175

cct aat agt gaa tac atg ttc atg gcg gca gtc aac aca aac aaa aag 576
Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys
180 185 190

tct aga ctt gca ggt gtg acc tca taa 603
Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser
195 200

<210> 6

60 <211> 836

<212> ADN

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

65 <221> CDS

<222> (35) .. (685)

ES 2 285 763 T3

<400> 6

```

ctggagggga agagtgcagc tgttcctggc agac atg aag ccc tac ttc tcg tgc 55
                               Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys
                               1       5

5   gtc ttt gtc ttc tgc ttc cta atc aaa ctt tta aca gga gaa ctc aat 103
    Val Phe Val Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Asn
          10                15                20

10  gac ttg gcc aat cac agg atg ttt tcg ttt cac gat gga ggt gta cag 151
    Asp Leu Ala Asn His Arg Met Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln
          25                30                35

15  att tct tgt aac tac cct gag act gtc cag cag tta aaa atg cag ttg 199
    Ile Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln Leu Lys Met Gln Leu
          40                45                50                55

20  ttc aaa gac aga gaa gtc ctc tgc gac ctc acc aag acc aag gga agc 247
    Phe Lys Asp Arg Glu Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser
          60                65                70

25  gga aac acc gtg tcc atc aag aat ccg atg tcc tgt cca tat cag ctg 295
    Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu
          75                80                85

30  tcc aac aac agt gtc tct ttt ttc cta gac aac gca gac agc tcc cag 343
    Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp Ser Ser Gln
          90                95                100

35  ggc agc tac ttt tta tgc agc ctg tcg att ttc gac cca ccc cct ttt 391
    Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe
          105                110                115

40  caa gaa aag aac ctt agt gga gga tat ttg ctt att tat gaa tcc cag 439
    Gln Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu Ile Tyr Glu Ser Gln
          120                125                130                135

45  ctt tgt tgc cag ctg aag ctt tgg tta ccc gta ggg tgt gca gct ttt 487
    Leu Cys Cys Gln Leu Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala Phe
          140                145                150

50  gtg gca gcg ctc ctt ttt gga tgc ata ttt atc gtc tgg ttt gca aaa 535
    Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys
          155                160                165

55  aag aag tac aga tcc agt gtg cac gac cct aat agc gag tac atg ttc 583
    Lys Lys Tyr Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu Tyr Met Phe
          170                175                180

60  atg gcg gca gtc aac aca aac aaa aag tcc aga ctt gca ggt aca gca 631
    Met Ala Ala Val Asn Thr Asn Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Thr Ala
          185                190                195

65  ccc ctt agg gct ttg ggg aga gga gaa cac tct tca tgt caa gac cgg 679
    Pro Leu Arg Ala Leu Gly Arg Gly Glu His Ser Ser Cys Gln Asp Arg
          200                205                210                215

70  aat taa tttgtttatt tctattttta aagaagaca ttttttcccc taaagataat 735
    Asn

    ttttgtattt ttatgtgaaa gtctgaatct tcattttaac tcgacttata tactctgtgg 795

    tatattaaaa ataatgtttg tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 836

```

<210> 7

<211> 27

ES 2 285 763 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 7	
10	ctgctcgaga tgaagcccta cttctcg	27
	<210> 8	
	<211> 32	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 8	
25	accctacggg taacggatcc ttcagctggc aa	32
	<210> 9	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
35	<400> 9	
40	taactgtttc tcgagaacat gaagtcaggc	30
	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
50	<400> 10	
	atcctatggg taacggatcc ttcagctggc	30
55	<210> 11	
	<211> 35	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
65	<400> 11	
	cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggc	35

ES 2 285 763 T3

	<210> 12	
	<211> 34	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 12	
	cattcaagtt tcagggaact agtccatgcg tttc	34
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		