

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 380**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2008 E 11194371 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2436781**

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

30 Prioridad:

**22.02.2007 US 891196 P**  
**13.11.2007 US 987752 P**  
**28.01.2008 US 24170 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.01.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**DIEHL, LAURI;**  
**FLANAGAN, KENNETH y**  
**MO, LIAN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 556 380 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para detectar una enfermedad inflamatoria del intestino

### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

**[0003]** El documento US 5.368.854 describe la utilización de IL-10 para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino. Los documentos WO 00/77026 y WO 00/61629 describen varias proteínas secretadas humanas.

**[0004]** Existe la necesidad de identificar marcadores biológicos adicionales de la enfermedad inflamatoria del intestino para uso en el diagnóstico de esta enfermedad crónica. La presente divulgación cubre esta necesidad.

35

### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

**[0005]** Se da a conocer en la presente memoria descriptiva el hallazgo único de que los miembros de la superfamilia de genes LY6 están regulados en exceso en la superficie de las células epiteliales intestinales (IEC) en modelos de colitis de murino y en tejido intestinal de pacientes humanos que experimentan IBD, cuyos genes no se expresan en IEC sanas. La mayoría de los miembros de la familia LY6 son glicoproteínas superficiales celulares ancladas por GPI con una amplia distribución en células de origen hematopoyético y una expresión más limitada en células no hematopoyéticas. Aunque ampliamente usados como marcadores de diferenciación de células inmunes (Sunderkotter, C. y col., J. Immunol. 172: 4410-4417 (2004)), las funciones que la familia LY6 posee han sido difíciles de elucidar (Shevach, E.M. y P.E. Kerty, Immunol. Today 10: 195-200 (1989)). Los informes han demostrado que las moléculas LY6 están implicadas en una gama diversa de funciones que incluyen la activación de linfocitos T (Zhang, Z.X. y col., Eur. J. Immunol. 32: 1584-1592 (2002) y Henderson, S.C. y col., J. Immunol. 168: 118-126 (2002)), olfato (Chou, J.H. y col., Genetics 157: 211-224 (2001) y adhesión celular (Jaakkola, I. y col., J. Immunol. 170: 1283-1290 (2003)).

50

**[0006]** En el sentido más amplio, se describe un procedimiento de detección del aumento de expresión de genes de la familia de genes LY6 humanos en tejido intestinal de un primer mamífero que experimenta una enfermedad intestinal con respecto a un mamífero del control. En un sentido más directo, se espera que el procedimiento sea aplicable al diagnóstico de trastornos relacionados con trastornos intestinales asociados con la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5 humanos, cuyos trastornos incluyen, sin limitación, la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD). En una realización, el procedimiento de la invención es útil para detectar respondedores y no respondedores al tratamiento terapéutico de la IBD. En una realización, la IBD es colitis ulcerosa (UC). En una realización, la IBD es la enfermedad de Crohn (CD). En una realización, el tejido intestinal es tejido de colon. En una realización, el tejido de colon es colon

55

sigmoideo. En una realización, la expresión génica de LY6H, LYPD1, LYPD23 y/o LYPD5 aumenta en tejido intestinal (tal como tejido de colon) en un mamífero con IBD, CD o UC con respecto a tejido intestinal normal (tal como tejido de colon normal) de un mamífero que no experimenta IBD, CD o UC. En una realización, el gen LY6H comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y codifica el polipéptido de LY6H que comprende la SEQ ID NO: 2.

5 En una realización, el gen LYPD1 comprende el ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 3 o 4 y codifica el polipéptido LYPD1 que comprende la SEQ ID NO: 5. En una realización, el gen LYPD3 comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 y codifica el polipéptido LYPD3 que comprende la SEQ ID NO: 7. En una realización, el gen LYPD5 comprende el ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 8 o 9 y codifica el polipéptido LYPD5 que comprende la SEQ ID NO: 10.

10

**[0007]** En una realización, el procedimiento de la invención comprende obtener una muestra de tejido procedente de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal, poner en contacto el tejido con un agente detectable que interactúa con la proteína LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o con ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y determinar el nivel de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3  
15 y/o LYPD5 con respecto a un tejido de control. En una realización, el aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 con respecto al control es indicativo de IBD en el mamífero de prueba. En una realización, el aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el tejido intestinal de prueba con respecto al tejido intestinal de control es indicativo de UC en el mamífero de prueba. En una realización, el tejido o las células procedentes de la prueba y del mamífero del control son del colon.

20

**[0008]** En una realización, la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 se determina mediante la detección de la expresión génica, tal como mediante la detección del ARNm que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido o células. En una realización, una muestra del control es una muestra de tejido o células del mismo tejido o tipo de células obtenidos de un mamífero conocido que no está experimentando un  
25 trastorno gastrointestinal, tal como IBD, UC o CD. En una realización, una muestra del control es un patrón universal que comprende ARN procedente de algunos tejidos normales o de múltiples líneas celulares. En análisis de micromatrices, tales patrones universales son útiles para vigilar y controlar la variación intra e interexperimental. En una realización, un patrón universal (o ARN de Referencia Universal (URR) se prepara tal como se proporciona por Novoradovskaya, N. y col., (2004) BMC Genomics 5: 20. En una realización, para uso como un control en el análisis  
30 de la micromatriz de ARN de ratón, el URR es un ARN de Referencia de Ratón Universal de Stratagene (nº de catálogo 740100, Stratagene®, La Jolla, CA.). En una realización, para uso como un control en un análisis de micromatriz de ARN humano, el URR es un ARN de Referencia Humano Universal de Stratagene® (nº de catálogo 740000). En una realización, para uso como un control en el análisis de la micromatriz de ARN de rata, el URR es un ARN de Referencia de Rata Universal de Stratagene® (nº de catálogo 740200). En una realización, en la que el ARN  
35 es ARN de ratón, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de embriones, fibroblastos de embriones, riñón, hepatocitos de hígado, macrófagos alveolares de pulmón, linfocitos B, linfocitos T (timo), glándulas mamarias, mioblastos de músculos, piel, y testículos. En una realización, en la que el ARN es ARN humano, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de adenocarcinoma de glándula mamaria, hepatoblastoma de hígado, adenocarcinoma de cuello de útero,  
40 carcinoma embrionario o de testículos, glioblastoma de cerebro, melanoma, liposarcoma, linfoma histiocítico (macrófagos, histiocitos), leucemia linfoblástica de linfoblastos T, melanoma plasmacitoma de linfocitos B. En una realización en la que el ARN es ARN de rata, las líneas celulares de las cuales se extrae el ARN total comprenden líneas celulares derivadas de leucemia basófila de la sangre, linfoma de linfocitos T de la sangre, hibridoma de linfoblastos B de la sangre, glioma cerebral, carcinoma embrionario de saco vitelino, fibroblasto embrionario normal,  
45 riñón normal, hepatoma de hígado, macrófago alveolar normal pulmonar, tipo II alveolar normal pulmonar, adenocarcinoma de glándula mamaria, mioblastos de músculo, piel normal, tumor de células de Leydig de los testículos.

**[0009]** En un aspecto, se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición  
50 de materia contenida en el interior del recipiente, en el que la composición de materia comprende un ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o sus complementos, y/o un anticuerpo o anticuerpos dirigido(s) contra LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y/o uno de sus fragmentos de unión dirigido contra LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, en el que los ácidos nucleicos y/o los anticuerpos son detectables. En una realización, la composición de la materia comprende detectar agentes para detectar la unión al ácido nucleico, tales como, sin limitación, los ácidos  
55 nucleicos que codifican LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o sus complementos, para el ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal. En una realización, la composición de materia comprende detectar agentes para detectar la unión del anticuerpo a, por ejemplo, LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una muestra de tejido de un mamífero de prueba sospechoso de experimentar un trastorno intestinal. En una realización, el anticuerpo de la composición está

marcado de manera detectable. En una realización, el anticuerpo de la composición es detectable mediante un segundo anticuerpo, cuyo segundo anticuerpo es detectable o marcado de manera detectable. El artículo puede comprender opcionalmente además un marcador prefijado al recipiente, o un envase insertado incluido con el recipiente, que se refiere al uso del ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o su complemento y/o al anticuerpo dirigido contra LY6H, dirigido contra LYPD1, dirigido contra LYPD3 y/o dirigido contra LYPD5 o uno de sus fragmentos de unión a LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en la detección del aumento de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido intestinal, incluyendo sin limitación, tejido de colon. En una realización, el trastorno intestinal es IBD. En una realización, el trastorno intestinal es UC o CD. En una realización, el polipéptido LYPD1 y el anticuerpo dirigido contra LYPD1 es un anticuerpo tal como se da a conocer en los documentos US 7.157.558 y US 7.144.990, respectivamente.

**[00010]** En un aspecto, se describe un procedimiento para diagnosticar la presencia de un trastorno intestinal en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (a) en una muestra de ensayo de tejido o células obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra del control de células normales conocidas procedentes de un mamífero que no experimenta un trastorno intestinal del mismo origen o tipo de tejido, en el que un nivel mayor de expresión del polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra del control, es indicativo de la presencia de un trastorno intestinal en el mamífero a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo. En una realización, el trastorno intestinal es IBD. En una realización, el IBD es UC. En una realización, el IBD es CD. En una realización, la detección puede ser poniendo en contacto un anticuerpo con el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, o un fragmento de unión del anticuerpo, con las muestras de ensayo y del control y determinar la cantidad relativa de formación del complejo anticuerpo-polipéptido. Un nivel mayor de formación del complejo anticuerpo-polipéptido en la muestra de ensayo con respecto a la muestra del control es indicativo de trastorno intestinal, tal como IBD, UC o CD, en el mamífero de prueba. El anticuerpo de la invención está marcado de manera detectable o, alternativamente, el anticuerpo se detecta mediante la posterior unión de un segundo anticuerpo que es detectable.

**[00011]** En una realización adicional, se describe un procedimiento para diagnosticar la presencia de un trastorno intestinal en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo que comprende tejido o células obtenidas a partir del mamífero de prueba con un oligonucleótido que se hibrida con un rigor alto al ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (o su complemento) o un anticuerpo que se une de manera específica al polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 y (b) detectar la formación de un complejo entre el oligonucleótido o el anticuerpo y el ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 (o su complemento) o el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, respectivamente, en la muestra de ensayo, en el que la formación de la mayoría de dicho complejo en la muestra de ensayo con respecto a una muestra del control es indicativa de la presencia de un trastorno intestinal (tal como IBD, UC o CD) en el mamífero de prueba. En una realización, el trastorno intestinal es IBD. En una realización, el trastorno es UC. En una realización, el trastorno es CD. En una realización, el tejido de los mamíferos de prueba y del control es tejido de colon. Opcionalmente, el anticuerpo de unión al polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o el oligonucleótido que hibrida el gen LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 empleado mediante el procedimiento de la invención es detectable, está marcado de manera detectable, unido a un soporte sólido, o similar, y/o la muestra de ensayo de tejido o células se obtiene a partir de un individuo sospechoso de experimentar un trastorno intestinal, en el que el trastorno es IBD, tal como, sin limitación, UC o CD.

**[00012]** En una realización adicional, se describe el uso de (a) un polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, (b) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 o un vector o célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de (a), (c) un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, o (d) un oligopéptido de unión a LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5, en la preparación de un medicamento útil para la detección diagnóstica de un trastorno intestinal, incluyendo sin limitación, IBD CD o UC, en un tejido intestinal de un mamífero, incluyendo sin limitación tejido de colon.

**[00013]** En un aspecto, la presente invención comprende un procedimiento para detectar una respuesta terapéutica a un fármaco en un mamífero tratado con un agente terapéutico de IBD, en el que el procedimiento comprende determinar la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido gastrointestinal de un mamífero de prueba con respecto a un tejido gastrointestinal del control de un mamífero del control, en el que un mayor nivel de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en un tejido de ensayo con respecto a un tejido del control indica un estado de enfermedad o la continuación del estado de enfermedad. Una diferencia en la expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el tejido de prueba que no sea significativamente mayor que la de los niveles de expresión del control normales o que esté comprendida dentro de un intervalo de niveles de expresión normales

para LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en una población de mamíferos indica la mejora o la resolución del trastorno intestinal, cuya mejora o resolución se puede atribuir al agente terapéutico. En una realización, se determina una respuesta terapéutica cuando los niveles de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en tejido gastrointestinal o de colon o células del mamífero tratado con un agente terapéutico son diferentes (la expresión es más similar al control normal, es decir, los niveles de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 son inferiores de los niveles de expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3 y/o LYPD5 en el mamífero antes del tratamiento).

**[00014]** Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia tras leer la presente memoria.

10

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[00015]** Las **Figuras 1A y 1B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica el polipéptido de LY6H humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6H humano (SEQ ID NO: 2).

15

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

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

20

Las **Figuras 4A y 4B** representan gráficamente las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NOS: 8 y 9) que codifican el polipéptido LYPD5 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYP5 humano que se muestra en la Figura 4C (SEQ ID NO: 10).

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

25

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

Las **Figuras 7A y 7B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 15) que codifica el polipéptido LYPD2 humano y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD2 humano (SEQ ID NO: 16).

Las **Figuras 8A-8H** representan gráficamente las secuencias de moléculas GLG-1 (ESL-1): (A-B) N° de Acceso U64791, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 17) que codifica el polipéptido GLG-1 (ESL-1) (SEQ ID NO: 18); (C-D) N° de Acceso NM\_012201, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 19) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 20); (E-F) N° de Acceso AK 172806, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 21) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 22); y N° de Acceso AK131501, secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 23) que codifica el polipéptido GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO: 24).

30

Las **Figuras 9A y 9B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 25) que codifica el polipéptido de LY6A de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6A de murino (SEQ ID NO: 26).

Las **Figuras 10A y 10B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 27) que codifica el polipéptido de LY6C de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6C de murino (SEQ ID NO: 28).

Las **Figuras 11A y 11B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 29) que codifica el polipéptido de LY6D de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6D de murino (SEQ ID NO: 30).

Las **Figuras 12A y 12B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 31) que codifica el polipéptido de LY6E de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6E de murino (SEQ ID NO: 32).

Las **Figuras 13A y 13B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 33) que codifica el polipéptido de LY6F de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6F de murino (SEQ ID NO: 34).

Las **Figuras 14A y 14B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 35) que codifica el polipéptido de LY6K de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6k de murino (SEQ ID NO: 36).

Las **Figuras 15A y 15B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 37) que codifica el polipéptido de LY6K de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6k de murino (SEQ ID NO: 38).

Las **Figuras 16A y 16B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 45) que codifica el polipéptido LYPD3 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD3 de murino (SEQ ID NO: 46).

Las **Figuras 17A y 17B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 47) que codifica el polipéptido de LY6H de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6H de murino (SEQ ID NO: 48).

Las **Figuras 18A y 18B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 49) que codifica el polipéptido LYPD1 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD1 de murino (SEQ ID NO: 50).

Las **Figuras 19A y 19B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 51) que codifica el polipéptido LYPD2 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido LYPD2 de murino (SEQ ID NO: 52).

Las **Figuras 20A y 20B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 53) que codifica el polipéptido de LY6g5c de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6g5c de murino (SEQ ID NO: 54).

Las **Figuras 20A y 20B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 53) que codifica el polipéptido de LY6g5c de murino y la secuencia de aminoácidos de polipéptido de LY6g5c de murino (SEQ ID NO: 54).

55

54).

Las **Figuras 21A y 22B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 55) que codifica el polipéptido de LY6g6c de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de LY6g6c de murino (SEQ ID NO: 56).

- 5 Las **Figuras 22A y 22B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 57) que codifica el polipéptido SLURP2/LYNX1 de murino y la secuencia de aminoácidos del polipéptido SLURP2/LYNX1 de murino (SEQ ID NO: 58)

La **Figura 23** muestra que los miembros de la familia LY6 están regulados en exceso en IEC en modelos de colitis en murino. Se aislaron las IEC del modelo de colitis IL10<sup>-/-</sup> (Figura 23A) y el de transferencia de CD45RB<sup>HI</sup> (Figura 23B) mediante LCM y se purificó el ARN. Se llevó a cabo el análisis de la micromatriz y se analizó tal como se describe en los Ejemplos. Los números representan el promedio del cambio de plegado en comparación con el ARN estándar universal de ratones colíticos sobre ratones sanos. Los números por debajo de la cartografía térmica indican la puntuación de inflamación del ratón individual.

Las **Figuras 24A-24D** muestran que la expresión superficial de las moléculas LY6 está regulada en exceso en IEC en el modelo IL10<sup>-/-</sup> de colitis. Ratones silvestres (Figura 24A) o IL10<sup>-/-</sup> (Figura 24B) se tiñeron para la expresión superficial de LY6A (verde, con color de contraste DAPI). De manera similar, ratones silvestres (Figura 24C) o IL10<sup>-/-</sup> (Figura 24D) se tiñeron para la expresión superficial de LY6C.

Las **Figuras 25A-25I** muestran que la expresión superficial de LY6A y LY6C está regulada en exceso en respuesta a citocinas inflamatorias, particularmente IFN $\gamma$ . Células YAMC se trataron con la citocina indicada durante 15 horas y se tiñeron para la expresión superficial de LY6C (Figura 25A) y LY6A (Figura 25B). Se cultivaron células YAMC durante 15 horas en presencia de dosis crecientes de IFN $\gamma$  y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 25C) y LY6A (Figura 25D). Se recogieron células YAMC estimuladas con IFN $\gamma$  en diversos momentos de tiempo, tal como se indica, y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 25E) y LY6A (Figura 25F). IL-22 reguló en exceso la expresión de LY6C (Figura 25G) y LY6A (Figura 25H). Los niveles de LY6A y LY6c estuvieron regulados en exceso en la línea IEC de murino, CMT93 en respuesta al tratamiento con IFN $\gamma$  (Figura 25I).

**Figuras 26A-26E.** El agotamiento de balsas lipídicas dio como resultado una inhibición de la producción de quimiocina medida por LY6C. Se incubaron células YAMC con colesterol agotado (barras oscuras) o no agotado (barras abiertas) con nati-KLH o anti-LY6C unido a placa tal como se indicó durante 15 horas. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7 (Figuras 26A-26C) Los niveles superficiales de LY6A (Figura 26D) y LY6C (Figura 26E) disminuyeron en respuesta al agotamiento del colesterol

Las **Figuras 27A-27D** muestran que la reticulación de LY6C, pero no la de LY6A, induce la regulación en exceso de la expresión superficial de LY6A y LY6C. Se incubaron células YAMC durante 24 horas en placas revestidas con anti-KLH del control, anti-LY6A o anti-LY6C y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6C (Figura 27A) o LY6A (Figura 27B). Se pretrataron las células durante 12 horas con 100 U/ml de IFN $\gamma$  y se plaquearon de manera similar en placas revestidas de anticuerpo y se analizaron para la expresión de LY6C (Figura 27C) o LY6A (Figura 27D).

Las **Figuras 28A-28C** muestran que la reticulación de LY6C, pero no la de LY6A, induce la secreción de quimiocinas. Figura 28A: Se preincubaron células YAMC o no, tal como se indica, con 100 U/ml de IFN $\gamma$  durante 15 horas y se cultivaron en placas revestidas con 10  $\mu$ g/ml de anti-LY6A (barras negras) o anti-LY6C (barras sombreadas) o anti-KLH del control (barras abiertas). Se aisló el ARN a las 24 (izquierda), 48 (centro) y 72 (derecha) horas y se analizó para la expresión de CXCL5 o CCL7 (A). Los datos indican el promedio  $\pm$  DE del cambio de plegado (tal como se determinó mediante el procedimiento  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) en comparación con células reticuladas isotópicas no tratadas. Figura 28B: Se recogieron los sobrenadantes a las 48 horas en las células reticuladas, como anteriormente, con 1, 5 o 10  $\mu$ g/ml (tal como se indica) de secreción de anticuerpo y se determinó la secreción de CXCL5 en el sobrenadante mediante ELISA, \* $<0,05$ . Figura 28C: Disminuyeron los niveles de CXCL5 y CXCL2 en respuesta a la reticulación de LY6C cuando los niveles de LY6C se inactivaron con ARNip.

Las **Figuras 29A-29B** muestran que las IEC en colitis poseen un modelo de expresión génica de la quimiocina similar. Se aislaron IEC en el modelo de colitis IL10<sup>-/-</sup> (Figura 29A) y en el de transferencia de CD45RB<sup>HI</sup> (Figura 29B) mediante LCM y se purificó el ARN. Se llevó a cabo el análisis de la micromatriz y se analizó tal como se describe en los Ejemplos. Los números representan el promedio del cambio del plegado en comparación con el ARN estándar universal de ratones colíticos sobre ratones sanos. Los números por debajo de la cartografía térmica indican la puntuación de la inflamación del ratón individual.

Las **Figuras 30A-30C** muestran que la expresión de los genes de la familia LY6 humana están regulados en exceso en las células de colon tratadas con citocinas. Células colo-205 humanas se trataron con las citocinas indicadas, o combinaciones de citocinas, durante 18 o 24 horas. Se muestra el aumento de plegado en la expresión de LY6H humano (Figura 30A), LYPD3 humano (Figura 30B), y LYPD5 humano (Figura 30C) con respecto a la  $\beta$ -actina del control.

- Las **Figuras 31A-31B** muestran que los pacientes con Enfermedad de Crohn tienen elevados niveles de LYPD1 (Figura 31A) y LYPD5 (Figura 31B) en el colon. Se obtuvieron muestras de tejido de pacientes de IBD humana y se determinó la expresión génica de LYPD1 y LYPD5. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de LYPD1 y LYPD5 en tejidos inflamados de pacientes de CD. Se observó también un aumento estadísticamente significativo de LYPD5 en tejidos inflamados de pacientes de UC. Los valores del eje Y reflejan la expresión génica con respecto a un patrón de ARN universal.
- Las **Figuras 32A y 32B** muestran (A) células COS sin transfectar, y (B) células COS transfectadas con el polipéptido GLG-1 (ESL-1) y teñidas con la proteína LYPD5-Fc.
- La **Figura 33A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 33B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5.
- La **Figura 34A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 34B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5.
- La **Figura 35A** representa gráficamente la estructura de GLG-1 o ESL-1 y diversos fragmentos adecuados para caracterizar la unión de LYPD5 y la **Figura 35B** muestra los resultados de un estudio de inmunoprecipitación simultánea que caracteriza la unión de LYPD5 y un ligando de LYPD5.
- Las **Figuras 36A y 36B** representan gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 68) que codifica la integrina humana, beta 7, y la secuencia de aminoácidos del polipéptido beta 7 de la integrina humana (SEQ ID NO: 69).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### Definiciones

- [00016]** “Enfermedad Inflamatoria del Intestino” o “IBD” se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva para referirse a las enfermedades del intestino que producen inflamación y/o ulceración e incluye, sin limitación, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
- [00017]** La “enfermedad de Crohn (CD)” o la “colitis ulcerosa (UC)” son enfermedades inflamatorias crónicas del intestino de etiología desconocida. La enfermedad de Crohn, a diferencia de la colitis ulcerosa, puede afectar cualquier parte del intestino. La característica más destacada de la enfermedad de Crohn es el engrosamiento edematoso granular púrpura rojizo de la pared del intestino. Con el desarrollo de la inflamación, estos granulomas pierden a menudo sus bordes circunscritos y se integran con el tejido que los rodea. La diarrea y la obstrucción del intestino son las características clínicas predominantes. Como con la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn no se cura mediante la resección del segmento de intestino implicado. La mayor parte de los pacientes con enfermedad de Crohn requieren cirugía en algún momento, pero son frecuentes las recaídas posteriores y es normal el tratamiento médico continuo.
- [00018]** La enfermedad de Crohn puede implicar cualquier parte del tracto alimentario desde la boca al ano, aunque normalmente aparece en las regiones ileocólica, del intestino delgado o colónica anorrectal. Histopatológicamente, la enfermedad se manifiesta por granulomas continuos, abscesos en la cripta, fisuras y úlceras aftosas. El infiltrado inflamatorio está mezclado, constituido por linfocitos (linfocitos T y B), células plasmáticas, macrófagos, y neutrófilos. Existe un aumento desproporcionado en las células plasmáticas que secretan IgM e IgG, macrófagos y neutrófilos.
- [00019]** Los fármacos antiinflamatorios sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) son útiles para tratar la enfermedad de Crohn colónica poco activa y se prescriben comúnmente para mantener la remisión de la enfermedad. Metroidazol y ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para tratar la enfermedad perianal. En los casos más graves, los corticoesteroides son eficaces en el tratamiento de las exacerbaciones activas y pueden incluso mantenerse hasta la remisión. Azatioprina y 6-mercaptopurina se han mostrado satisfactorios en pacientes que requieren la administración crónica de corticoesteroides. Es también posible que estos fármacos puedan jugar un papel en la profilaxis a largo plazo. Desafortunadamente, existe un retraso muy largo (de hasta seis meses) antes del comienzo de la acción en algunos pacientes.
- [00020]** Los fármacos antidiarreicos pueden proporcionar también alivio sintomático en algunos pacientes. La terapia nutricional o la dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir la mejora de la enfermedad aguda, pero no inducen remisiones clínicas sostenidas. Se usan antibióticos en el tratamiento

secundario del crecimiento en exceso bacteriano en el intestino delgado y en el tratamiento de complicaciones piógenas.

**[00021]** La “colitis ulcerosa” (UC) afecta al intestino grueso. El curso de la enfermedad puede ser continuo o con recaídas, leves o graves. La lesión más temprana es una infiltración inflamatoria con formación de abscesos en la base de las criptas de Lieberkühn. La coalescencia de estas criptas distendidas y rotas tiende a separar la mucosa que las cubre de su suministro de sangre, lo que conduce a la ulceración. Los síntomas de esta enfermedad incluyen la aparición de cólicos, dolor abdominal inferior, sangrado rectal, y frecuente, heces sueltas constituidas principalmente por sangre, pus y moco, con escasas partículas fecales. Puede necesitarse una colectomía total para la colitis aguda, grave o crónica, sin remisión

**[00022]** Las características clínicas de la UC son muy variables, y el comienzo puede ser gradual o súbito, y puede incluir diarrea, tenesmo y sangrado rectal recurrente. Con implicación rápida de todo el colon, se puede producir una emergencia con riesgo para la vida, el megacolon tóxico. Las manifestaciones extraintestinales incluyen artritis, pioderma gangrenoso, uveítis y eritema nudoso.

**[00023]** El tratamiento de la UC incluye sulfasalazina y fármacos que contienen salicilato relacionados para casos leves y fármacos corticoesteroides en casos graves. La administración tópica tanto de salicilatos como de corticoesteroides es algunas veces eficaz, particularmente, cuando la enfermedad está limitada al intestino distal, y se asocia con pequeños efectos secundarios en comparación con el uso sistémico. Las medidas de apoyo, tales como la administración de hierro y de agentes antidiarreicos están indicadas en algunos casos. Se prescriben también algunas veces azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato para uso en casos refractarios dependientes de corticoesteroides.

**[00024]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “miembro de la familia de genes LY6” o “miembro de la superfamilia de genes LY6” se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva para referirse a un gen que tiene homología con los miembros de la familia de genes LY6, la mayoría de cuyos miembros de la familia de genes son glicoproteínas superficiales celulares ancladas a GPI con amplia distribución en células de origen hematopoyético y expresión más limitada en células no hematopoyéticas. Los miembros de esta familia de genes se usan como marcadores de la diferenciación de células inmunes (Sunderkotter, C. y col., J. Immunol. 172: 4410-4417 (2004)). Se han examinado los genes de la familia LY6 (Shevach, E.M. y P.E. Korty, Immunol. Today 10: 195-200 (1989)) y las funciones incluyen la activación de los linfocitos T (Zhang, Z.X. y col., Eur. J. Immunol. 32: 1584-1592 (2002) y Henderson, S.C. y col., J. Immunol. 168: 118-126 (2002)), olfato (Chou, J.H. y col., Genetics 157: 211-224 (2001) y adhesión celular (Jaakkola, I. y col., J. Immunol. 170: 1283-1290 (2003)). Los miembros de la familia de genes LY6 incluyen, sin limitación, miembros de la familia de genes LY6 de mamíferos, tales como los genes de la familia LY6 de ratón o ser humano. Tal como se usa aquí, “gen LY6” se refiere a un miembro de la familia de genes LY6 y “polipéptido de LY6” se refiere al polipéptido codificado por un gen LY6. Los miembros de la familia de genes LY6 de murino incluyen, sin limitación, LY6A (NM\_010738, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 25 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 26), LY6C (mM\_010741, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27, que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 28); LY6D (NM\_003695, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 29 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 30), LY6E (mM\_002346, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 31 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 32), LY6F (NM\_008530, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 33 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 34), LY6I (NM\_020498, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 35 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 36), y LY6K (NM\_017527, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 37 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 38). Los miembros de la familia de genes LY6 humano incluyen, sin limitación, LY6H (NM\_002347, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 2), LYPD1 (NM\_144586, ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 3 o 4 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 5), LYPD3 (NM:014400, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 7), LYPD5 (NM\_182573, ácido nucleico de las SEQ ID NOS: 8 o 9 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 10), LY6D (NM\_003695, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 11 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 12), LY6E (NMNM\_002346, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 13 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 14), LYPD2 (NM\_205545, ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15 que codifica el polipéptido de SEQ ID NO: 16). En las realizaciones, el polinucleótido de cada miembro de la familia de genes LY6 dado a conocer en la presente memoria descriptiva comprende al menos 15, al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1250, al menos 1500, al menos 1750, al menos 2000, o al menos 2040 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57, o el polinucleótido miembro de la familia de genes LY6 comprende las SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57. En una realización, un polinucleótido que se une a un polinucleótido miembro de la familia de genes LY6 (SEQ ID NOS: 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55, o 57), o uno de sus fragmentos, tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un



85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o u 100 % de identidad de la secuencia con el polipéptido de LY6 o uno de sus fragmentos. En una realización, el polipéptido miembro de la familia de genes LY6 comprende al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, o al menos 325, al menos, aminoácidos contiguos de las SEQ ID NOS: NOs: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58, o el polipéptido miembro de la familia de genes LY6 comprende las SEQ ID NOS: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58.

**[00025]** Un "polipéptido de secuencia natural" de cualquiera de los miembros de la familia de genes LY6 comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido miembro de la familia de genes LY6 correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos LY6 de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de LY6 de secuencia natural" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido de LY6 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente de corte y empalme) y las variantes alélicas que se producen naturalmente del polipéptido. En un aspecto específico, los polipéptidos LY6 de secuencia natural dados a conocer en la presente memoria descriptiva son polipéptidos de secuencia natural maduros o de longitud completa que corresponden a las secuencias en las Figuras 1-7 y las SEQ ID NOS: 2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56, o 58.

**[00026]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, una "variante del polipéptido de LY6" significa un polipéptido de LY6, preferiblemente, sus formas biológicamente activas, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, y sus formas variantes que carecen del péptido señal, un dominio extracelular, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa tal como se referencia en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polipéptidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o se eliminan uno o más restos de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. En un aspecto específico, dichas variantes de polipéptidos tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, para un polipéptido de secuencia del polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, y sus formas variantes que carecen de un péptido señal, un dominio extracelular, o cualquier otro fragmento de un polipéptido de LY6 de secuencia natural de longitud completa tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva.

**[00027]** "Porcentaje ( %) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de polipéptido de LY6 identificada en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los restos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido de LY6 específica, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y de no considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para conseguir la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los objetivos de la presente memoria descriptiva, sin embargo, % de valores de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo del programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 ha sido autorizado por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la Tabla 1 siguiente ha sido completado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en la que se ha registrado con el U.S. Copyright Registration N<sup>o</sup>. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se configuran mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

**[00028]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva “polinucleótido variante LY6” o “secuencia de ácido nucleico variante de LY6”, o “gen LY6” se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido miembro de la familia del gen LY6, preferiblemente, sus formas biológicamente activas, tal como se define en la presente memoria descriptiva, y que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa identificada en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia del polipéptido de LY6 de longitud completa respectiva tal como se identifica en la presente memoria descriptiva (tal como la codificada por un ácido nucleico un ácido nucleico que representa solo una porción de la secuencia de codificación completa de un polipéptido de LY6 de longitud completa). Ordinariamente, dichas variantes de polinucleótidos tendrán al menos aproximadamente un 80 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia del polipéptido de LY6 de la secuencia natural de longitud completa respectiva o cualquier otro fragmento de la secuencia del polipéptido de LY6 de longitud completa respectiva identificada en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polinucleótidos no abarcan la secuencia de nucleótidos natural.

**[00029]** Ordinariamente, dichas variantes de polinucleótidos varían al menos aproximadamente en 50 nucleótidos de longitud desde el polipéptido de la secuencia natural, alternativamente, la varianza puede ser al menos aproximadamente de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto, el término “aproximadamente” significa la longitud de la secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia más o menos un 10 % de la longitud a la que se hace referencia.

**[00030]** “Porcentaje ( %) de identidad de la secuencia de ácido nucleico” con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido del gen LY6 identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia del ácido nucleico del gen LY6 de interés, respectivamente, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico se puede conseguir de diversas formas que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, el uso del software informático a disposición pública tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente memoria descriptiva, sin embargo, el % de valor de identidad de la secuencia de ácido nucleico se genera usando el programa informático de generación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo del programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 ha sido diseñado por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la Tabla 1 siguiente se ha presentado junto a la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, en la que se ha registrado con el U.S. Copyright Registration N°. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se configuran mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

**[00031]** En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de una secuencia C de ácido nucleico dada para, o frente a una secuencia D de ácido nucleico dada (que se puede nombrar como una secuencia C de ácido nucleico dada que tiene o comprende algún % de identidad de la secuencia de ácido nucleico para, con, o frente a una secuencia D de ácido nucleico dada) se calcula como sigue:

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

en el que W es el número de nucleótidos puntuados como correspondencias idénticas mediante el programa ALIGN-2 de alineación de secuencias en el que la alineación del programa de C y D, y e el que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia C de ácido nucleico no es igual a la longitud de la secuencia D de ácido nucleico, el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de C y D no será igual al %

de identidad de la secuencia de ácido nucleico de D y C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de la secuencia de ácido nucleico, las Tablas 4 y 5, demuestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada "ADN de Comparación" con la secuencia de ácido nucleico designada "REF-DNA", en la que "REF-DNA" representa una secuencia hipotética de ácido nucleico que codifica el gen LY6 de interés, el "ADN de Comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que la molécula de ácido nucleico "REF-DNA" de interés se está comparando, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos. A no ser que se establezca de manera específica de otra manera, todos los valores del porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico usados en la presente memoria descriptiva se obtuvieron tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

**[00032]** En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes del gen LY6 son moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de LY6, respectivamente, y que son capaces de hibridarse, preferiblemente con hibridación y condiciones de lavado rigurosas, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de LY6 de longitud completa, respectivamente, tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva. Dichas variantes de polipéptidos pueden ser aquellas que están codificadas por dichas variantes de polinucleótidos.

**[00033]** "Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos LY6 dados a conocer en la presente memoria descriptiva, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir normalmente con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, dichos polipéptidos se purificarán (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de recipiente giratorio, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Dichos polipéptidos aislados incluyen los polipéptidos correspondientes *in situ* en el interior de células recombinantes, debido a que al menos un componente del polipéptido de LY6 de su entorno natural no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, dichos polipéptidos aislados se prepararán mediante al menos una etapa de purificación.

**[00034]** Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de LY6 "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas anteriormente mencionadas es diferente en forma o configuración de las que se encuentran en la naturaleza. Cualquiera de dichas moléculas de ácido nucleico se distinguen por tanto de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido específico como se encuentran en las células naturales.

**[00035]** El término "secuencias control" se refiere a las secuencias de AD necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operable en un organismo hospedador particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se conocen células eucariotas que utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

**[00036]** El ácido nucleico está "unido de manera operable" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretora se une de manera operable con el ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma se une de manera operable a una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. Generalmente, "unido de manera operable" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de la líder secretora, contiguas en la fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

**[00037]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva "expresión" como se aplica a expresión génica, se refiere a la transcripción de un gen que codifica una proteína para producir un ARNm así como la traducción del ARNm para producir la proteína codificada por el gen. De esta manera, la expresión creciente o decreciente se refiere a la transcripción creciente o decreciente de un gen y/o a la traducción creciente o decreciente del ARNm resultante de la transcripción.

**[00038]** Una persona normalmente experta en la técnica determina con facilidad el "rigor" de las reacciones de hibridación, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para una hibridación  
5 apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado de volverse a hibridar cuando están presentes las cadenas complementarias en un entorno por debajo de la temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, resulta que temperaturas relativas más altas tenderían a volver las condiciones de reacción más  
10 rigurosas, mientras que temperaturas más bajas las disminuirían. Para detalles adicionales y una explicación del rigor de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

**[00039]** "Condiciones rigurosas" o "condiciones de elevado rigor" tal como se define en la presente memoria  
15 descriptiva, se pueden identificar por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y elevada temperatura de lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1 % en 50EC, (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/ Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM en 42EC; o (3) hibridación durante la noche en una disolución que emplea formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50  
20 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1 %, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % en 42EC, con un lavado de 10 minutos en 42EC en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) seguido por un lavado con rigor elevado de 10 minutos consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA en 55EC.

**[00040]** Se pueden identificar "condiciones moderadamente rigurosas" tal como se describe en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas tales como las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la  
30 incubación durante la noche a 37EC en una disolución que comprende: formamida al 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC en aproximadamente 37-50EC. La persona normalmente experta en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., a medida que sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la  
35 sonda y similares.

**[00041]** El término "epítoto etiquetado", cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de LY6, o un agente de unión a un polipéptido de LY6 fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítoto  
40 frente al cual se puede formar un anticuerpo, que sea todavía lo suficientemente corto de tal manera que no interfiera con la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido etiqueta es también lo suficientemente único de tal manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de manera cruzada con otros epítotos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de  
45 aminoácidos).

**[00042]** "Activo" o "actividad", para los objetivos de la presente memoria descriptiva se refiere a la(s) forma(s) de polipéptidos que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo que se produce naturalmente, en el que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (tanto inhibidora como  
50 estimuladora) producida por un polipéptido nativo que se produce naturalmente diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítoto antigénico poseída por un polipéptido nativo que se produce naturalmente, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítoto antigénico poseída por un polipéptido nativo que se produce naturalmente. Un polipéptido activo, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, es un antígeno que se expresa diferencialmente tanto desde  
55 una perspectiva cualitativa como cuantitativa, en un tejido IBD, con respecto a su expresión en un tejido similar que no está afectado con IBD.

**[00043]** El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido natural dado a conocer en la

presente memoria descriptiva. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o secuencias de aminoácidos variantes de polipéptidos, péptidos, oligonucleótidos de sentido contrario, pequeñas moléculas orgánicas, naturales, etc. Los procedimientos para identificar antagonistas puede comprender poner en contacto dicho polipéptido, incluyendo una célula que  
5 exprese éste, con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con dicho polipéptido.

**[00044]** “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refiere a un tratamiento terapéutico y profiláctico o a las medidas preventivas, en el que el objeto es evitar o retrasar (disminuyendo) la progresión de una enfermedad. El tratamiento  
10 puede referirse también a la modificación de la progresión de una IBD.

**[00045]** “Diagnosticar” se refiere al proceso de identificar o determinar las características distintivas de una enfermedad que incluye, sin limitación, IBD, UC y/o Enfermedad de Crohn. El proceso de diagnosticar se expresa también algunas veces como tipificación o clasificación de la enfermedad basándose en la gravedad de la  
15 progresión de la enfermedad así como en la localización (tal como, por ejemplo, la localización en el interior o a lo largo del tracto gastrointestinal en el que se encuentra la inflamación y/o la expresión génica alterada).

**[00046]** Los sujetos que necesitan diagnóstico incluyen aquellos que experimentan ya una expresión aberrante de LY6 así como aquellos propensos a tener o aquellos en los que se va a evitar la expresión aberrante de LY6. Por  
20 consiguiente, un aspecto de la invención es la detección de la respuesta a un fármaco terapéutico en un mamífero tratado con un agente terapéutico para el tratamiento de la IBD, en el que el procedimiento comprende determinar la expresión de LY6 en el tejido gastrointestinal de un mamífero de prueba con respecto a un control y determinar que los niveles de expresión de LY6 están comprendidos y no son significativamente diferentes de los niveles de expresión del control normal. En una realización, se determina una respuesta terapéutica cuando los niveles de  
25 expresión de LY6 del mamífero tratado con un agente terapéutico son diferentes (la expresión es más similar al control normal, es decir, los niveles de expresión de LY6 son inferiores que los niveles de expresión de LY6 que tenía el mamífero antes del tratamiento).

**[00047]** Los anteriores parámetros para evaluar el tratamiento satisfactorio y la mejora en la enfermedad son  
30 fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para la terapia de la IBD, se puede medir la eficacia, por ejemplo, evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando el índice de respuesta (RR) Se pueden realizar biopsias para evaluar la expresión génica y observar la histopatología del tejido gastrointestinal procedente del paciente. La invención descrita en el presente documento relacionada con el procedimiento de pronóstico y/o diagnóstico implica la determinación y la evaluación de la regulación en exceso  
35 de la expresión del gen LY6.

**[00048]** “Mamífero” o “sujeto mamífero”, para los objetivos del tratamiento de, aliviar los síntomas de o el diagnóstico de una IBD se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, los animales domésticos y de granja, y del zoo, para deportes o animales de compañía, tales como perros, gatos,  
40 ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, hurones, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

**[00049]** Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

**[00050]** “Vehículos” tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o mamífero que se está exponiendo a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa a pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones  
50 tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sub>7</sub>, polietilenglicol (PEG), y  
55 PLURONICS<sub>7</sub>.

**[00051]** Por “fase sólida” o “soporte sólido” se entiende una matriz no acuosa a la cual se puede adherir o unir un polipéptido, ácido nucleico, anticuerpo o agente de unión de LY6. Los ejemplos de fases sólidas abarcados en la presente memoria descriptiva incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (*por ejemplo*, vidrio poroso

controlado), polisacáridos (*por ejemplo*, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (*por ejemplo*, una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos N° 4.275.149.

5 [00052] Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación en bicapa similar a la disposición de los lípidos en las membranas  
10 biológicas.

[00053] Una “molécula pequeña” o “pequeña molécula orgánica” se define en la presente memoria descriptiva por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

15 [00054] Una “cantidad eficaz” de un agente antagonista es una cantidad suficiente para producir un efecto fisiológico, tal como sin limitación para inhibir, parcial o completamente, la función del gen o de su proteína codificada. Una “cantidad eficaz” se puede determinar de manera empírica y de una manera rutinaria, en relación con este objetivo.

20 [00055] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a un antagonista u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso de la IBD, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco restaurará la expresión aberrante de LY6 a niveles fisiológicos normales; reducirá la inflamación gastrointestinal, reducirá el número de lesiones gastrointestinales; y/o aliviará en alguna extensión uno o más de los síntomas asociados con la IBD, UC y/o CD. Véase la definición en la presente memoria descriptiva de “tratar”.  
25

[00056] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un antagonista es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente un tumor, *por ejemplo*, una célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. A efectos de inhibir el crecimiento celular neoplásico, se puede determinar dicha cantidad empíricamente y de una manera rutinaria.  
30

[00057] Una “cantidad citotóxica” de un antagonista es una cantidad capaz de producir la destrucción de una célula, especialmente una célula proliferativa, por ejemplo, una célula cancerosa, tanto *in vitro* como *in vivo*. A efectos de inhibir el crecimiento de las células neoplásicas, se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.  
35

[00058] El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre de manera específica, por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra LY6 (incluyendo anticuerpos antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos dirigidos contra LY6 con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios dirigidos contra LY6, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, biespecíficos) y fragmentos de unión a antígeno (véase a continuación) de todos los anticuerpos anteriormente enumerados siempre que presenten la actividad biológica o inmunológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se usa indistintamente con el de anticuerpo en la presente memoria descriptiva.  
40

[00059] Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso del anticuerpo tal como se ha determinado mediante el procedimiento de Lowry, y lo más preferible más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de recipiente giratorio, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes debido a que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, se preparará el anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.  
50  
55

[00060] La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una proteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H) (un anticuerpo IgM consiste en 5 unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene por tanto 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes

polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también 5 puentes disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por tres dominios constantes ( $C_H$ ) para cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$  y cuatro dominios  $C_H$  para los isotipos  $\mu$  y  $\epsilon$ . Cada cadena L tiene en el extremo N, un dominio variable ( $V_L$ ) seguido por un dominio constante ( $C_L$ ) en su otro extremo. El  $V_L$  está alineado con el  $V_H$  y el  $C_L$  está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada ( $C_H1$ ). Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables 10 de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un  $V_H$  y un  $V_L$  juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de los diferentes tipos de anticuerpos, véase, *por ejemplo*, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

15 **[00061]** Se puede asignar la cadena L de cualquier especie de vertebrado a uno o dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas ( $C_H$ ), se pueden 20 asignar inmunoglobulinas a diferentes tipos o isotipos. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Los tipos  $\gamma$  y  $\alpha$  se dividen 25 adicionalmente en subtipos sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de  $C_H$ , *por ejemplo*, los seres humanos expresan los siguientes subtipos. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

**[00062]** El término "variable" se refiere al hecho de que algunos segmentos de los dominios variables difieren 30 extensamente en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión del antígeno y define la especificidad de un anticuerpo concreto por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de aproximadamente un tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En vez de esto, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco (FR) de 35 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que son cada una de 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y 30 ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración en lámina  $\beta$ , que adoptan en gran parte una configuración en lámina  $\beta$ , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina  $\beta$ . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables 35 procedentes de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

40 **[00063]** El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" 45 (*por ejemplo*, en torno a aproximadamente los restos 24-34 de Kabat (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la  $V_L$ , y en torno a aproximadamente los restos 31-35B de Kabat (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la  $V_H$  (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo*, en torno a aproximadamente los 50 restos 26-32 de Chothia (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la  $V_L$ , y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en la  $V_H$  (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

50 **[00064]** El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homólogos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al(a los) mismo(s) epítipo(s), excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes generalmente dichas variantes en cantidades menores. Dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una 55 secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon entre una pluralidad de clones, tales como un combinado de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión diana seleccionada se puede alterar adicionalmente, por

ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión diana alterada es también un anticuerpo monoclonal. En contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos 5 contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante o un antígeno. Adicionalmente a su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en que están normalmente sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye como producción que necesita del anticuerpo 10 mediante cualquier procedimiento particular: Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden realizar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), recombinant DNA methods (véase., Patente de 15 los Estados Unidos N<sup>o</sup>. 4.816.567), tecnologías de expresión en fagos (véanse, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee y col. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes de todos los loci o genes de la inmunoglobulina 20 humana que codifican las secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immuno*, 7: 33 (1993); Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; Documento WO 1997/17852; Patentes de los Estados Unidos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks y col., 25 *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

**[00065]** Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera 30 idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a un tipo o subtipo particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así como a los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 35 6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado como se usa en la presente memoria descriptiva es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

**[00066]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos 40 quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, restos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se 45 sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo tal como la afinidad de unión. Generalmente, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de la 50 inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en las FR es normalmente de no más de 6 en la cadena H, y de no más de 3 en la cadena L. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones y col., *Nature* 321: 522-525 (1986); Reichmann y 55 col., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

**[00067]** "Fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmento de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos, anticuerpos lineales (véase Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.641.870,



Ejemplo 2; Zapata y col., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

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

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

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

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

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

**[073]** Un antagonista de LY6 (por ejemplo, anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula pequeña) "que se

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

**[074]** Además, el término “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico de” un polipéptido de LY6 particular o un epítipo de un polipéptido de LY6 diana particular significa que esta unión se puede medir de una manera diferente a una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula del control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica mediante competición con una molécula control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica está indicada si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe competitivamente por exceso de la diana no marcada. En una realización, dichos términos se refieren a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido. Alternativamente, dichos términos se pueden describir mediante una molécula que tiene una kd para la diana de al menos aproximadamente  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M, o más.

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

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

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

- [078]** El término "agente citotóxico" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radioactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y sus fragmentos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como pequeñas moléculas de toxinas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, plantas o animales, incluyendo fragmentos y/o sus variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos dados a conocer a continuación. Se describen a continuación otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida produce la destrucción de las células tumorosas.
- [079]** Un "agente quimioterapéutico" o "agente terapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de un trastorno o enfermedad. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos o terapéuticos para el tratamiento de la IBD incluyen sin limitación fármacos antiinflamatorios de sulfasalazina y ácido 5-aminosalicílico (5-ASA); el Metroidazol y la ciprofloxacina son similares en eficacia a la sulfasalazina y parecen ser particularmente útiles para el tratamiento de la enfermedad perianal; en los casos más graves, los corticoesteroides son eficaces en el tratamiento de las exacerbaciones y pueden incluso mantener la remisión; azatioprina, 6-mercaptopurina, y metotrexato han mostrado también éxitos en pacientes que requieren la administración crónica de corticoesteroides; Los fármacos antidiarreicos pueden proporcionar también alivio sintomático en algunos pacientes; la terapia nutricional o la dieta elemental pueden mejorar el estado nutricional de los pacientes e inducir la mejora sintomática de la enfermedad aguda; los antibióticos se usan en el tratamiento secundario del crecimiento bacteriano en exceso en el intestino delgado y en el tratamiento de las complicaciones piógenas. Los agentes quimioterapéuticos de la IBD incluyen además agentes biológicos y otros agentes como los que siguen: anticuerpos dirigidos contra beta7 (véase, por ejemplo, documento WO2006026759), anticuerpos dirigidos contra alfa4 (tales como ANTEGEN®) anticuerpo dirigido contra TNF (REMICADE®) o compuestos sin proteínas que incluyen, sin limitación, compuestos 5-ASA, ASACOL®, PENTASA™, ROWASA™, COLAZAL™, y otros compuestos tales como Purinetol y esteroides tales como prednisona. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer incluyen hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina; agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN7; alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altetramina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelaimina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL7); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN7), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR7), acetilcamptotecina, escoplectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; caliestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofiloxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicamicina, especialmente calicamicina gamma 1I y calicamicina omega 1I (véase por ejemplo., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como neocarzinostatina cromóforo y cromoproteínas relacionadas cromóforos de antibióticos de enediina, aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina, ADRIAMYCIN7 doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C. ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozaocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina. 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziucuaona; elfomitina; acetato de eliptinico; una epotilonina; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxirea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguaona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo PSK7 de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido

tenuazónico ; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2 , verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE7, FILDESIN7); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL7 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM exento de cromóforo, formulación de nanopartículas de albúmina  
 5 genomanipuladas de (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE7 (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR7); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN7); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN7); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE7); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilmitina  
 10 (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA7); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

15

**[080]** El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otras células como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas están las hormonas del crecimiento tales como la hormona humana del crecimiento , N-metionil hormona humana del crecimiento, y la hormona bovina  
 20 del crecimiento; la hormona paratiroidea; la tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina, hormonas de glicoproteínas tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH), y la hormona luteneizante (LH); el factor hepático del crecimiento; factor de crecimiento de los fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO),  
 25 factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor I y II de crecimiento tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL- 1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal  
 30 como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que incluyen el ligando LIF y kit (KL). Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o procedentes de cultivos celulares recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencias naturales.

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

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

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

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

**[085]** El término "expresión en exceso" tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los

niveles celulares de expresión génica de un tejido que son superiores a los niveles de expresión normales de este tejido. El término “expresión en defecto” tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los niveles celulares de expresión génica de un tejido que son inferiores a los niveles de expresión normales de este tejido. En cualquier caso, la expresión superior o inferior es significativamente diferente de la expresión normal en las 5 condiciones controladas del estudio.

**[086]** Un “control” incluye una muestra obtenida para uso en la determinación de los niveles iniciales o la expresión normal o la actividad en un mamífero que no experimenta la IBD. De acuerdo con esto, se puede obtener una muestra del control mediante numerosos medios, que incluyen de tejidos o células no afectados por la 10 inflamación y/o la IBD, UC o CD (tal como se determina mediante técnicas normalizadas), de células o tejidos sin IBD, por ejemplo, de las células de un sujeto que no experimenta IBD; de sujetos que no tienen una IBD, enfermedad de Crohn, o trastorno de colitis ulcerosa; de sujetos no sospechosos de estar en riesgo de una IBD, CD o UC; o de las células o líneas de células derivadas de dichos sujetos. Un control incluye también un patrón 15 previamente establecido. Para los ensayos, tales como los ensayos de ARNm, que incluyen los ensayos de micromatriz, un control puede ser un control universal. Dicho control universal se refiere a la información de la expresión del ARN de un gen LY6 concreto obtenido del ARN aislado de una mezcla de tejidos sanos o de una mezcla de líneas celulares derivadas de diversos tejidos tales como, sin limitación, los ARN universales de referencia dados a conocer en la presente memoria descriptiva. De acuerdo con esto, cualquier prueba o ensayo 20 llevado a cabo de acuerdo con la invención se puede comparar con el patrón establecido y puede no ser necesario obtener una muestra del control para comparación cada vez.

**Tabla 1**

```

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

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

```

Tabla 1 (cont. 1)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont. 2)

```

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

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

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

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

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

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

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

```



Tabla 1 (cont. 3)

```

/* do the alignment, return best score: main( )
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw( )
{
    char      *px, *py;           /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1;       /* insertion penalties */
    register  id;               /* diagonal index */
    register  ij;               /* jmp index */
    register  *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;           /* index into seqs */

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

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

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

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

Tabla 1 (cont. 4)

...nw

```

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont. 5)

```

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

```

...DW

Tabla 1 (cont. 6)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont. 7)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;                                /* leading trailing overlap */
{
    int    nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char   outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

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

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

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

```

Tabla 1 (cont. 8)

```

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

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

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

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

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

```

...getmat

pr\_align

Tabla 1 (cont. 9)

```

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

        more++;

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

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

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

```

...pr\_align

dumpblock

Tabla 1 (cont. 10)

```

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

/*
 * put out a number line: dumpblock( )
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

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

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

```



Tabla 1 (cont. 11)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

...putline

stars

Tabla 1 (cont. 12)

```

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

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

```

Tabla 1 (cont. 13)

```

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

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

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

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

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

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

```

cleanup

getseq

Tabla 1 (cont. 14)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getseq

g\_alloc

readjmps

Table 1 (cont. 15)

...readjumps

```

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

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

```

**Tabla 1 (cont. 16)**

```

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

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

```

**Tabla 2**

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

5

**Tabla 3**

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

**Tabla 4**

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

Tabla 5

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

### Procedimientos diagnósticos

5 [087] Se contempla adicionalmente que el uso de agentes terapéuticos para la IBD se puede dirigir específicamente a trastornos en los que el tejido y/o las células afectadas presentan una expresión creciente de LY6 con respecto al control. De acuerdo con esto, se contempla que la detección de la expresión creciente de LY6 se puede usar para detectar la IBD, tal como la CD o la UC, en el tejido gastrointestinal de un mamífero y/o para identificar tejidos y trastornos que se beneficiaran de manera particular del tratamiento con un agente terapéutico de la IBD, incluyendo un agente quimioterapéutico, útil en la mejora de la IBD, la UC y/o la CD en un paciente humano.

15 [088] En las realizaciones preferidas, se detectan los niveles de expresión de LY6, tanto mediante detección directa del gen transcrito como mediante la detección de los niveles o la actividad de las proteínas. Se pueden detectar los transcritos usando cualquiera de una amplia gama de técnicas que dependen principalmente de la hibridación o de las sondas de los transcritos de ARNm de LY6, para sintetizar los ADNc de las anteriores, o para el ADN en el que está presente la amplificación del gen LY6. Las técnicas bien conocidas incluyen la transferencia Northern, la PCR mediante transcriptasa inversa y el análisis de micromatriz de los niveles de los transcritos. Los procedimientos para detectar los niveles de la proteína LY6 incluyen la transferencia Western, la inmunoprecipitación, la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D SDS-PAGE – preferiblemente en comparación frente a un patrón en el que se ha determinado la posición de las proteínas LY6), y la espectroscopía de masas. Se puede acoplar la espectroscopía de masas con una serie de etapas de purificación para permitir la identificación de alto rendimiento de muchos niveles de proteínas diferentes en una muestra particular. La espectrometría de masas y la 2D SDS-PAGE se pueden usar también para identificar las modificaciones después de la transcripción de las proteínas que incluyen los episodios proteolíticos, la ubiquitinación, fosforilación, modificación de lípidos, etc. Se puede evaluar también la actividad de LY6 analizando la unión del ADN al sustrato o en la activación de la transcripción *in vitro* de los promotores diana. El ensayo de modificación en gel, los ensayos de la huella de ADN, y los ensayos de reticulación del ADN-proteína son todos procedimientos que se pueden usar para evaluar la presencia de una proteína capaz de unirse a los sitios de unión Gli en el ADN. J Mol. Med 77(6):459-68 (1999); Cell 100(4): 423-34 (2000); Development 127(19): 4923-4301 (2000).

30 [089] En algunas realizaciones, se midieron los niveles de LY6 transcrito, y los tejidos enfermos o con trastornos que mostraron niveles de LY6 significativamente elevados con respecto al control, se trataron con un compuesto terapéutico de la IBD. De acuerdo con esto, los niveles de expresión de LY6 son una medida diagnóstica poderosa para determinar si un paciente está experimentando la IBD y si este paciente debe recibir un agente terapéutico de la IBD.

### Composiciones de anticuerpos para uso en los procedimientos de la invención

#### A. Anticuerpos dirigidos contra LY6

40 [090] En una realización, la presente invención da a conocer el uso de anticuerpos dirigidos contra LY6, que pueden encontrar uso en la presente memoria descriptiva como agentes terapéuticos, diagnósticos y/o pronósticos en la determinación de la existencia, gravedad de y/o pronóstico del curso de la enfermedad de una enfermedad inflamatoria del intestino tal como la UC. Los anticuerpos a modo de ejemplo que se pueden usar para dichos objetivos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados. El término "anticuerpos" incluye también algunas veces los fragmentos de unión a antígeno. Están comercialmente disponibles anticuerpos dirigidos contra LY6, tales como, por ejemplo, de R&D Systems, Minneapolis, MN. Se pueden obtener comercialmente anticuerpos que se unan específicamente a LY6 como antígenos o prepararse mediante procedimientos normalizados conocidos en la técnica de los anticuerpos y de la química de proteínas para uso en el procedimiento de la invención. Se dan a conocer anticuerpos para LYPD, por ejemplo, en el documento USUS7.144.990.

## 1. Anticuerpos policlonales

**[091]** Los anticuerpos policlonales se estimulan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y de un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunógena en la especie que se va a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar en hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, *por ejemplo*, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina) glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , en el que R y  $\text{R}^1$  son diferentes grupos alquilo.

**[092]** Se inmunizaron animales frente al antígeno, conjugados inmunógenos, o derivados combinando, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales recibieron un estímulo de refuerzo con 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o del conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, los animales se sangraron y se evaluó el suero para el título del anticuerpo. Los animales recibieron un estímulo de refuerzo hasta que los títulos llegaron a la meseta. Se pueden formar también conjugados en cultivos celulares recombinantes como fusiones de proteínas. También, agentes de agregación tales como el alum se usan de manera adecuada para aumentar la respuesta inmune.

## 2. Anticuerpos monoclonales

**[093]** Se pueden crear anticuerpos monoclonales usando el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden crear mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567).

**[094]** En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente para estimular los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán de manera específica a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Tras la inmunización, se aislaron los linfocitos y a continuación se fusionaron con una línea de células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

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

**[096]** Las células de mieloma compañeras de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan de manera estable altos niveles de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio selectivo que las selecciona frente a las células parentales sin fusionar. Las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma de murino, tales como las derivadas de los tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón, disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y SP-2 y derivadas, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU. Se han descrito también líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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



[098] Se puede determinar, por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal mediante el análisis Scatchard descrito en Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

5 [099] Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones limitando los procedimientos de dilución y haciéndolos crecer mediante procedimientos normalizados (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este objetivo incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640, se pueden hacer crecer las células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascites en un  
10 animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en ratones.

[0100] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de manera adecuada del medio de cultivo, fluido de ascites, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, *por ejemplo*, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o proteína G-Sefarosa) o  
15 cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0101] El ADN que codificaba los anticuerpos monoclonales se aisló y se secuenció fácilmente usando procedimientos convencionales (usando, por ejemplo, sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de murino). Las células de  
20 hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra forma la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos para revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo incluyen  
25 Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

[0102] En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de bibliotecas anticuerpos contra fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*,  
348: 552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)  
30 que describen el aislamiento de Anticuerpos de murino y sr humano, respectivamente, Usando bibliotecas de fagos. Posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia de construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). De esta manera, estas técnicas son alternativas viables  
35 a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0103] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión sustituyendo, por ejemplo, las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y la  
40 cadena ligera humanas ( $C_H$  y  $C_L$ ) por las secuencias homólogas de murino (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia de codificación de la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias del polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios  
45 constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprenda un sitio de combinación a antígeno para un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

### **3. Anticuerpos humanos y humanizados**

50 [0104] Los anticuerpos dirigidos contra LY6 útiles en la práctica de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, de murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas  
55 (anticuerpo receptor) en las cuales los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en las secuencias del

anticuerpo receptor ni en la CDR o el marco importados. En general, el anticuerpo humanizados comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado 5 comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

**[0105]** Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. 10 Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)), 15 sustituyendo las CDR o secuencias de la CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567) , en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos resto de la FR 20 se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

**[0106]** La elección de dominios variables humanos, ligero y pesado, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano dirigido contra ratón) cuando se pretende que el anticuerpo sea para uso terapéutico humano. De acuerdo 25 con el procedimiento del "mejor ajuste" así denominado, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de las secuencia conocidas del dominio variable humano. La secuencia del dominio V humano que se encuentra más cercana a la del roedor se identifica y la región marco humana (FR) en el interior d ésta se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región marco particular derivada 30 de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar el mismo marco para algunos anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta y col., J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

**[0107]** Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de una elevada afinidad de 35 unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir esta meta, de acuerdo con un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que 40 ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es *decir*, el análisis de los restos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse con su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse entre las secuencias receptora e importada de tal manera que se consiga la característica 45 deseada del anticuerpo, tal como el aumento de afinidad por el(los) antígeno(s) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y lo más sustancialmente implicados en influenciar la unión del antígeno.

**[0108]** Se contemplan diversas formas de anticuerpos humanizados del anticuerpo dirigido contra LY6. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga 50 opcionalmente con uno o más agente(s) citotóxico(s) con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

**[0109]** Como una alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces, tras la inmunización, d 55 producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones mutantes de una línea quimérica y germinal da como resultado la completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos

humanos tras el estímulo del antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno. 7: 33 (1993); Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm): 5.545.807; y documento WO 97/17852.

5

**[0110]** Alternativamente, se puede usar la tecnología de expresión de fagos (McCafferty y col., Nature 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios génicos del dominio variable de la inmunoglobulina (V) procedentes de donantes inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en cualquiera de un gen de la proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M 13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan también como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. De esta manera, el fago imita alguna de las propiedades del linfocito B. Se puede llevar a cabo la expresión del fago en una variedad de formatos, revisada en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Se pueden usar diversas fuentes de segmentos del gen V para la expresión del fago. Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivada de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (que incluye autoantígenos) que se pueden aislar siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también, Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.565.332 y 5.573.905.

**[0111]** Tal como se ha discutido anteriormente, se pueden generar también anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse Patentes de los Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

#### **4. Fragmentos de anticuerpo**

**[0112]** En algunas circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpo, más bien que de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un rápido aclaramiento, reteniendo a la vez una similar especificidad de unión al antígeno de la molécula de longitud completa correspondiente, y puede conducir a una mejora del acceso a tumores sólidos.

**[0113]** Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, *por ejemplo*, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de esta manera la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos dirigidos contra fagos discutidas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra solución, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> con semivida creciente *in vivo* que comprenden restos de epítomos de unión a receptores salvajes se describen en la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes al profesional experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.571.894; y la Patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; de esta manera, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión sFv se pueden construir para dar como resultado la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los términos amino o carboxilo de una sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, más arriba. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", *por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

55

#### **5. Anticuerpos biespecíficos**

**[0114]** Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unir antígenos separados o unir los

dos diferentes epítomos de un polipéptido de LY6 concreto descrito en la presente memoria descriptiva. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar el anterior sitio de unión de LY6 con un sitio de unión para otra proteína. Cuando el anticuerpo biespecífico es útil en el procedimiento de la invención, el segundo brazo de anticuerpo puede unir un polipéptido detectable. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

**[0115]** Se conocen en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera, en las que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y col., Nature 10 305: 537-539 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se lleva a cabo usualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante molesta, y los rendimientos del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/088829, y en Trauneker y col., EMBO J. 15 10: 3655-3659 (1991).

**[0116]** De acuerdo con una solución diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de la Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra  $C_H2$ , y  $C_H3$ . Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada ( $C_H1$ ) conteniendo el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión separados, y se transfecta simultáneamente en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos 25 usados en la construcción proporcionan el óptimo rendimiento del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible, insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las relaciones no tienen efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de la cadena deseada.

**[0117]** En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por la 30 cadena pesada de una inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de la cadena de inmunoglobulina no deseada, ya que la presencia de una cadena ligera de 35 inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil forma de separación. Se da a conocer esta solución en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121: 210 (1986).

**[0118]** De acuerdo con otra solución descrita en la Patente de los Estados Unidos N° 5.731.168, la interfase 40 entre una pareja de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte del dominio  $C_H3$ . En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas secundarias de aminoácidos de la interfase del primer anticuerpo se sustituyen con cadenas secundarias más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar de la(s) cadena(s) secundaria(s) grande(s) 45 se crean sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas secundarias de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como los homodímeros.

**[0119]** Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno 50 d los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados encuentran uso también en el presente procedimiento de la invención 55 para proporcionar múltiples marcadores detectables (tanto diferentes como iguales) en cada anticuerpo para una mejora en la detección del ensayo. Se pueden crear anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Se conocen bien en la técnica los agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con numerosas técnicas de reticulación.

- [0120]** Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan y col., *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de complejación del ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditiolos próximos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos  $Fab'$  generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados  $Fab'$ -TNB se reconvierte a continuación en el  $Fab'$ -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de los otros derivados  $Fab'$ -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.
- [0121]** Recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos  $Fab'$ -SH de *E.coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula  $F(ab')_2$  de un anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento  $Fab'$  se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra las dianas de tumores de mama humanos.
- [0122]** Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente desde el cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos en cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones  $Fab'$  de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento se puede utilizar también para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un  $V_H$  conectado a un  $V_L$  por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. De acuerdo con esto, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan para emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando por tanto dos sitios de unión a antígeno. Se ha informado también de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros  $Fv$  monocatenarios ( $sFv$ ). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).
- [0123]** Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

## **6. Anticuerpos multivalentes**

- [0124]** Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual los anticuerpos se unen. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de tipo IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetraivalentes), que se pueden producir fácilmente mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminoterminal en la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente memoria descriptiva comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (y preferiblemente dos cadenas de polipéptidos), en el que la(s) cadena(s) de polipéptido(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido(s) pueden comprender  $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ , en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptido(s) pueden comprender una cadena de la región VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-Fc; o una cadena de la región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva comprende además preferiblemente al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede, por ejemplo, comprender entre aproximadamente dos y aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un

dominio CL.

## **7. Genomanipulación de la función efectora**

5 **[0125]** Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo por tanto la formación del enlace disulfuro intercadena en esta  
10 región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento aumentada y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véase Caron y col., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Se pueden preparar también Anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral aumentada Usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente,  
15 se puede genomanipular un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener por consiguiente una lisis aumentada del complemento y capacidades ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989). Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "epítipo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida de la molécula de IgG en suero *in vivo*.

## **8. Inmunoconjugados**

25 **[0126]** La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo, es decir, un radioconjugado) y/o una marcador detectable.

### **30 a. Agentes quimioterapéuticos**

**[0127]** Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de  
35 *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfarsarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de la diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), el inhibidor de momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina, y los tricotecenos. Están disponibles una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I,  
40 <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, y <sup>186</sup>Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de dimetil adipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), bis-azido compuestos (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-  
45 etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-fifluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase documento WO94/11026.

50

**[0128]** Se contemplan también en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicamicina, maitansinoides, un tricoteno, y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

### **55 B. Oligopéptidos de unión a LY6**

**[0129]** Los oligopéptidos de unión a LY6 de la presente invención son oligopéptidos que se unen, preferiblemente de manera específica, con un polipéptido de LY6 tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos de unión a LY6 se pueden sintetizar químicamente usando la metodología conocida

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

**[0130]** A este respecto, la expresión del bacteriófago (fago) es una técnica bien conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar el(los) miembro(s) de aquellas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión del fago es una técnica mediante la cual variantes de polipéptidos se expresan como proteínas de fusión para el revestimiento de la proteína sobre la superficie de partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la expresión del fago se basa en el hecho de que se pueden clasificar de manera rápida y eficaz grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas de manera selectiva (o ADNc clonados de manera aleatoria) para las secuencias que se unen a una molécula diana con elevada afinidad, La expresión de las bibliotecas peptídicas (Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o la proteína (Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha usado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos para unos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad usando el receptor diana, y un medio de evaluar los resultados de los enriquecimientos de la unión. Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143.

**[0131]** Aunque la mayor parte de procedimientos de expresión de fagos han usado fagos filamentosos, se conocen también sistemas de expresión de fagos lambdaoides (documento WO 95/34683; documento U.S. 5.627.024), sistemas de expresión de fagos T4 (Ren y col., Gene, 215: 439 (1998); Zhu y col., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang y col., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren y col., Gene, 195(2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov y col., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión de fagos T7 (Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905).

**[0132]** Se han desarrollado en la actualidad muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión de fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión de cribar bibliotecas de péptidos para la unión a moléculas diana seleccionadas y a las propiedades funcionales de expresión con el potencial de cribado de estas proteínas para las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos combinatorios de reacción para las reacciones de expresión de fagos (documento WO 98/14277) y se han usado las bibliotecas de expresión de fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (Documentos WO 98/20169; WO 98/20159) y las propiedades de péptidos helicoidales restringidos (documento WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un procedimiento de aislar un ligando de afinidad en el que la biblioteca de expresión de fagos se pone en contacto con una disolución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda disolución en la que el ligando de afinidad no se unirá con la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un procedimiento de someter a ciclos de selección de fagos por afinidad una biblioteca de expresión de fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación aislar el fago de unión seguido por un procedimiento de selección de fagos por microafinidad usando pocillos de microplacas para aislar fagos de unión de elevada afinidad. Se ha informado también el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como una etiqueta de afinidad (Li y col. (1998) Mol Biotech., 9: 187). El documento WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustratos para distinguir las especificidades enzimáticas

usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión de fagos. Un procedimiento para seleccionar enzimas adecuadas para el uso en detergentes usando la expresión de fagos se describe en el documento WO 97/09446. Se describen procedimientos adicionales de selección de proteínas de unión en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.498.538, 5.432.018, y en el documento WO 98/15833.

5

**[0133]** Los procedimientos para generar bibliotecas de péptidos y cribar estas bibliotecas se dan también a conocer en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, y 5.723.323.

10 **[0134]** En un aspecto, la presente invención se refiere a ligandos del polipéptido LYPD5. La Figura 32 demuestra esto mostrando células COS sin transfectar (A) y células COS transfectadas con GLG-1 y teñidas con la proteína LYPDS-Fc. En una realización, el ligando de LYPD5 es la glicoproteína 1 (GLG-1) localizada en el complejo de Golgi o el polipéptido de la E-selectina (ESL-1) tal como se muestra en las SEQ ID NOS:18, 20, 22, ó 24, codificados por el ácido nucleico que se muestra como las SEQ ID NOS: 17, 19, 21, o 23, respectivamente. En otra  
15 realización, el polinucleótido que codifica un polipéptido GLG-1 comprende al menos 15, al menos 25, al menos , al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 750, al menos 1000, al menos 1250, al menos 1500, al menos 1750, al menos 2000, al menos 2040, al menos 2090, al menos 2150, al menos 2200, al menos 2300, al menos 2400, al menos 2500, al menos 2600, al menos 2700, al menos 2800, al menos 2900, al menos 3000, al menos 3100, al menos 3200, al menos 3300, al menos 3400, al menos 3500, al menos 3600, al menos  
20 3700, o al menos 3720 nucleótidos contiguos de las SEQ ID NOS 17, 19, 21, o 23, o el polinucleótido que codifica un GLG-1 comprende las SEQ ID NOS 17, 19, 21, o 23. En una realización, un polinucleótido que se une a un polinucleótido que codifica un GLG-1 (SEQ ID NOS: 17, 19, 21, o 23), o uno de sus fragmentos, tiene al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de la secuencia con el polipéptido GLG-1 o uno de sus fragmentos. En una  
25 realización, el polipéptido GLG-1 comprende al menos 10, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 225, al menos 250, al menos 275, al menos 300, al menos 325, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650, al menos 700, al menos 750, al menos 800, al menos 850, al menos 900, al menos 950, al menos 1000, al menos 1050, al menos 1100, al menos 1150, o al menos 1200 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NOS: 18, 20,  
30 22, o 24, o el polipéptido GLG-1 comprende las SEQ ID NOS: 18, 20, 22, o 24. GLG-1 o ESL-1 se expresan en neutrófilos, se cree que están implicados en la extravasación de los neutrófilos en los tejidos, y se piensa que juegan un papel importante en la inflamación (véase Hidalgo et al. (2007) Immunity, 26(4): 477-489). GLG-1 o ESL-1 tienen 14 dominios GLG1 ricos en cisteína. El dominio extracelular (ECD) es prolongado y como se describe a continuación, se encontraron variantes o fragmentos del ECD de GLG1 que tenían la capacidad de unirse a LYPD5.

35

**[0135]** En una realización, el ligando LYPD5 es una variante o fragmento de una molécula de GLG-1 o ESL-1 descrita en la presente memoria descriptiva. Tal como se muestra en la Figura 33A-B, GLG-1 o ESL-1 pueden verse como los fragmentos 1, 2, 3 y 4 y se describen en el Ejemplo 11, uno cualquiera de los 4 fragmentos es suficiente para la unión de LYPD5. Puede ser

40

**[0136]** En una realización, el ligando LYPD5 es una variante o fragmento de GLG-1 o ESL-1 que es un único dominio GLG-1. Tal como se muestra en la Figura 34A-B, GLG-1 se prepara de múltiples dominios GLG-1 y como se describe en el Ejemplo 11, un único dominio GLG-1 es suficiente para la unión de LYPD5.

45 **[0137]** En una realización, el ligando LYPD5 es una variante o fragmento de GLG-1 o ESL-1 que es específica de LYP5. Tal como se muestra en la Figura 35A-B, GLG-1 incluye los dominios 26-114, el dominio 115 y el dominio 150 y como se describe en el Ejemplo 11, el dominio 115 se une a LYPD5 pero los dominios 26-114 no se unen a LYPD5.

50 **[0138]** La presente invención contempla variantes de GLG-1 de la misma manera que contempla variantes para los miembros de la familia de LY6.

### **C. Variantes de polipéptidos**

55 **[0139]** Además de los polipéptidos, los anticuerpos y los polipéptidos de unión de LY6 descritos en el presente documento, se contempla en la presente memoria descriptiva que se puedan preparar variantes de dichas moléculas para el uso con la invención. Dichas variantes se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante la síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos después de la traducción de estas



moléculas, tales como el cambio de número o posición de los sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje de la membrana.

**[0140]** Se pueden realizar variaciones en la secuencia de aminoácidos usando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas que se muestran, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican la secuencia de aminoácidos que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia natural. Opcionalmente, la variación se realiza mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de la secuencia de aminoácidos de interés. La directriz para determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar adversamente la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia de la secuencia de aminoácidos de interés con moléculas homólogas de la proteína conocida y minimizar el número de cambios de la secuencia de aminoácidos con otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es *decir*, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones y delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. Se puede determinar la variación permitida realizando inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos de manera sistemática en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad presentada por la secuencia natural de longitud completa o madura.

**[0141]** Se proporcionan en la presente memoria descriptiva fragmentos de diversos polipéptidos. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína natural de longitud completa. Dichos fragmentos que carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada son también útiles con los procedimientos dados a conocer.

**[0142]** Los anteriores fragmentos de polipéptidos se pueden preparar mediante cualquier número de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Una solución alternativa implica generar dichos fragmentos mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida que escinda las proteínas en los sitios definidos por los restos de aminoácidos particulares, o difiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica el fragmento deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, dichos fragmentos comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con la correspondiente molécula de longitud completa.

**[0143]** En realizaciones concretas, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezado de las sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, se introducen a continuación más cambios sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 6, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a los tipos de aminoácidos, y se criban los productos con el fin de identificar la variante deseada.

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

**[0144]** Se llevan a cabo modificaciones sustanciales en la función de la identidad inmunológica del polipéptido de LY6 seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena secundaria. Los restos que se producen naturalmente se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena secundaria:

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

15 **[0145]** Sustituciones no conservativas que implicarán el intercambio de un miembro de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituido se pueden introducir también en los sitios de sustitución conservativos o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

20 **[0146]** Se pueden realizar las variaciones usando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al emplazamiento), barrido de alanina, y mutagénesis mediante la PCR. Se pueden llevar a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento (Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), mutagénesis mediante casete (Wells y col., Gene, 34: 315 (1985)), mutagénesis de selección mediante restricción (Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)) u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir la molécula anti-LY6.

25 **[0147]** Se puede emplear también el análisis de barrido de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos junto a una secuencia contigua. Entre los aminoácidos barridos preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. Entre este grupo, un aminoácido barrido preferido es normalmente la alanina debido a que elimina la cadena secundaria más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)). Se prefiere también normalmente la alanina debido a que es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones soterradas y expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)). Si la sustitución de la alanina no da como resultado cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

30 **[0148]** Se puede sustituir también cualquier resto de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada del polipéptido de LY6, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. De manera inversa, se pueden añadir enlace(s) de cisteína a dicha molécula para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

35 **[0149]** Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de regiones hipervariables de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando la expresión de fagos. De manera breve, algunos sitios de la región hipervariable están mutados para generar todas las posibles sustituciones de

amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones del producto génico III del M13 empaquetado en el interior de cada partícula. Las variantes que expresaron fagos se cribaron a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se ha dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Con el fin de identificar sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido diana. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos de sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para desarrollo adicional.

**[0150]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos variantes de los polipéptidos LY6 se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al emplazamiento), mutagénesis mediante la PCR, y mutagénesis mediante casete de una secuencia natural o en una variante preparada anteriormente.

20

#### **D. Modificaciones de polipéptidos**

**[0151]** Los polipéptidos y/o anticuerpos que se han modificado covalentemente pueden ser también adecuados para el uso dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos dirigidos de dichos anticuerpos y polipéptidos con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas secundarias seleccionada o los restos N o C terminales de dichos anticuerpos y polipéptidos. Es útil la derivatización con agentes bifuncionales, por ejemplo, para reticular las moléculas anteriores a una matriz soporte insoluble en agua o superficie para uso en la purificación. Los agentes reticulantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

**[0152]** Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutamilo y asparaginilo con los restos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de lisina, arginina, y de las cadenas secundarias de histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación del amino N terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

**[0153]** Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos o anticuerpos comprende alterar el modelo natural de glicosilación del anticuerpo o polipéptido. Se pretende que "alterar el modelo natural de glicosilación" para los objetivos de la presente memoria descriptiva signifique eliminar uno o más restos carbohidratos que se encuentran en la secuencia natural (tanto eliminando el sitio de glicosilación subyacente como eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia natural respectiva. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas naturales, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de diversos restos carbohidratos presentes.

**[0154]** La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos está normalmente tanto unida a N como unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena secundaria de un resto asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena secundaria de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetil galactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácidos, más comúnmente serina o treonina, aunque se puede usar también 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

**[0155]** La adición de sitios de glicosilación se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que contenga una o más de las anteriores secuencias tripeptídicas descritas (para los sitios de glicosilación unidos a N). Se puede realizar también la alteración mediante la adición de, o la sustitución por, uno o

más restos de serina o treonina a la secuencia del mencionado anticuerpo o polipéptido original (para los sitios de glicosilación unidos a O). Dicha secuencia de anticuerpo o polipéptido se puede alterar opcionalmente mediante cambios a nivel del ADN, particularmente, mutando el ADN que codifica las secuencias de aminoácidos anteriores en bases preseleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

5

**[0156]** Otro medio de aumentar el número de restos carbohidratos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Se describen dichos procedimientos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

10

**[0157]** La eliminación de restos carbohidratos se puede llevar a cabo química o enzimáticamente o mediante sustituciones mutacionales de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Se conocen en la técnica técnicas de desglicosilación química y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) y en Edge y col., *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). Se puede conseguir la escisión enzimática de restos carbohidratos en polipéptidos mediante una variedad de endo y exoglicosidasas tal como se describe por Thotakura y col., *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

15

**[0158]** Otro tipo de modificación covalente comprende la unión con uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera que se muestra en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.640.835; 4.496.689, 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. El polipéptido de LY6 puede estar también atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Se dan a conocer dichas técnicas en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>a</sup> edición, Oslo, A., Ed., (1980).

20

25

**[0159]** Las modificaciones que forman moléculas quiméricas son el resultado de fusiones de un polipéptido con otro, se contemplan polipéptidos heterólogos o secuencias de aminoácidos para uso con los presentes procedimientos.

30

**[0160]** En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al cual se puede unir de manera selectiva un anticuerpo anti etiqueta. El epítipo etiqueta se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo de dicho anticuerpo o polipéptido. Se puede detectar la presencia de dichas formas de epítipos etiquetados de dichos anticuerpos o polipéptido usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la provisión del epítipo etiqueta permite que dichos anticuerpos o polipéptidos se purifiquen fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiquetas y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la anterior (Evan y col., *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del Herpes Simple y su anticuerpo (Paborsky y col., *Protein Engineering*, 3(6): 547-553 (1990)). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp y col., *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)); el péptido del epítipo KT3 (Martin y col., *Science*, 255: 192-194 (1992)); un péptido del epítipo de la  $\alpha$ -tubulina (Skinner y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)); y la etiqueta del péptido de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)).

35

40

45

**[0161]** En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (denominada también como una "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo o polipéptido anterior en el lugar de al menos una región variable en el interior de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, o la bisagra, las regiones CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la patente de los Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

50

55

## **E. Preparación de polipéptidos**

**[0162]** La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de dichos anticuerpos, polipéptido y oligopéptidos. El término “polipéptidos” puede incluir anticuerpos, polipéptidos y oligopéptidos. Se contempla, por supuesto, que procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, se puedan emplear para preparar dichos anticuerpos, polipéptido y oligopéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o sus porciones, se pueden producir mediante síntesis peptídica directa usando técnicas en fase sólida [véase, *por ejemplo*, Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. Se puede llevar a cabo la Síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o automatizadas. Se puede llevar a cabo la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems (Foster City, CA) usando la instrucciones del fabricante. Algunas porciones de dichos anticuerpos, polipéptidos u oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el producto deseado.

### 15 **1. Aislamiento del ADN que codifica un polipéptido**

**[0163]** Se puede obtener el ADN que codifica un polipéptido de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se piensa que posee dicho anticuerpo, polipéptido u oligopéptido de ARNm y expresa éste a un nivel detectable. De acuerdo con esto, el ADN que codifica dichos polipéptidos se puede obtener convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, una biblioteca genómica o mediante procedimientos conocidos (*por ejemplo*, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

**[0164]** Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés p la proteína codificada por éste. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos normalizados, tales como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Alternativamente, se puede usar la metodología de la PCR [Sambrook y col., más arriba: Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

**[0165]** Se conocen bien en la materia las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas de tal manera que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferiblemente de tal manera que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos de marcado, e incluyen el uso de radiomarcas del tipo de ARP marcado con <sup>32</sup>P, la biotilación o el marcado con enzimas. En Sambrook y col, más arriba se proporcionan condiciones de hibridación, que incluyen rigor moderado y rigor elevado.

**[0166]** Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. Se puede determinar la identidad de la secuencia (a cualquier nivel de aminoácido o nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa, usando procedimientos conocidos en la técnica tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

**[0167]** Se puede obtener el ácido nucleico que tiene la secuencia que codifica la proteína cribando el ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida dada a conocer en la presente memoria descriptiva por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión de cebadores tal como se describe en Sambrook y col., más arriba, para detectar precursores y procesar intermedios del ARNm que no se pueden transcribir de manera inversa en el ADNc.

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

**[0168]** Las células hospedadoras se transfectaron o transformaron con los vectores de expresión o de clonación descritos en la presente memoria descriptiva para la producción del polipéptido de LY6 y se cultivaron en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codificaban las secuencias deseadas. El técnico experto puede seleccionar las condiciones del cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, sin experimentación innecesaria. En general, los principios, los protocolos, y las técnicas principales para maximizar la productividad de

los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., más arriba.

**[0169]** La persona normalmente experta conoce los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , y electroporación mediada por liposomas. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo usando técnicas normalizadas apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook y col., más arriba, o la electroporación, se usa generalmente para los procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de algunas células vegetales, tal como se describe en Shaw y col., Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de Junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). Se han descrito los aspectos generales de las transfecciones en sistemas hospedadores de células de mamíferos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.399.216. Se llevan a cabo normalmente transformaciones en levaduras de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, se pueden usar también otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliomitina. Para las diversas técnicas de transformación de células de mamíferos, véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336: 348-352 (1988).

**[0170]** Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células procariotas, de levaduras, o de eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Están públicamente disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* k12 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más bien que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido debido a que es una cepa hospedadora común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican las proteínas endógenas del hospedador, incluyendo los ejemplos de dichos hospedadores la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA* completo; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA ptr3* completo; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección de *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.946.783 otorgada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados los procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, la PCR u otras reacciones de la polimerasa con el ácido nucleico.

**[0171]** Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, y proteínas de fusión de anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más económica. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.), y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. Tras la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado en células adecuadas (por ejemplo, células CHO).

**[0172]** Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras son adecuados hospedadores de clonación o expresión de los vectores que codifican los polipéptidos deseados. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383

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

**[0173]** Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de la producción de polipéptidos glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y células hospedadoras de insectos permisivas procedentes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Están disponibles una variedad de cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y se pueden usar dichos virus como los virus en la presente memoria descriptiva, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

**[0174]** Sin embargo, hay un gran interés en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo de tejidos) ha llegado a ser un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en un cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de ratas Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2)

**[0175]** Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción del polipéptido deseado y cultivados en medios nutrientes convencionales según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

45

### **3. Selección y uso de un vector replicable**

**[0176]** El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el polipéptido de LY6 respectivo se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Están públicamente disponibles diversos vectores. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un(os) sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligadura normalizadas que el técnico experto conoce.

**[0177]** Se puede producir el polipéptido deseado de manera recombinante no solo directamente, sino también

como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o el polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componentes del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica la secuencia madura que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o las líderes de la enterotoxina II térmicamente estable. Para la secreción de la levadura, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la líder de la invertasa de la levadura, la líder del factor alfa (que incluye las líderes del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, descritas posteriormente en la Patente de los Estados Unidos N° 5.010.182, o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179, publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, se pueden usar secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tal como las secuencias señal procedentes de los polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como las líderes secretorias víricas.

15 **[0178]** Ambos vectores, de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levaduras, y algunos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV p BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

20 **[0179]** Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, *por ejemplo*, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

30 **[0180]** Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados de células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación de ácido nucleico que codifican la proteína deseada, tal como DHFR o la timidina cinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea el DHFR natural en la línea de células CHO deficiente en la actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para el uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura [Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

40 **[0181]** Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor unido de manera operable a la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos deseada, con el fin de dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen bien los promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la  $\beta$ -lactamasa y de la lactosa [Chang y col., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281: 544 (1979)], el sistema promotor de la fosfatasa alcalina y el triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776], y los promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida de manera operable al ADN que codifica la secuencia de la proteína deseada.

50 **[0182]** Los ejemplos de secuencias promotoras deseadas para uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otros enzimas glicolíticos [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucos-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfogluconasa isomerasa, y glucocinasa.

55 **[0183]** Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del hidrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de



levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

**[0184]** La transcripción del ADN en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 de Simios (SV40), procedentes de promotores de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

10

**[0185]** Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el polipéptido deseado insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elemento del ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los potenciadores incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado posterior del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia de codificación de las secuencias de aminoácidos anteriores, pero se localiza preferentemente en el sitio 5' desde el promotor.

15

20

**[0186]** La expresión de los vectores usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, seres humanos, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) contendrán también las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', sin traducir de ADN eucariotas o víricos o de ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica en anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo descrito en esta sección.

25

30

**[0187]** Otros procedimientos vectores, y células hospedadoras adicionales adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido respectivo en cultivos celulares recombinantes de vertebrados se describen en Gething y col., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281: 40-46 (1979); documento EP 117.060; y documento EP 117.058.

#### 35 **4. Cultivo de células hospedadoras**

**[0188]** Las células hospedadoras usadas para producir el polipéptido de LY6 se pueden cultivar en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Adicionalmente, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem.102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINJ), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en las concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incluir también cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones apropiadas que conocerán los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, y similares, son aquellas anteriormente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para las personas normalmente expertas en la técnica.

45

50

#### 55 **5. Detección de la amplificación/expresión génica**

**[0189]** Se pueden medir la amplificación y/o la expresión génica en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], inmunotransferencia (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente

55

memoria descriptiva. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dupletes específicos, incluyendo dupletes de ADN, dupletes de ARN, y dupletes híbridos de ADN-ARN o dupletes de ADN-proteínas. Los anticuerpos, a su vez, se pueden marcar y se puede llevar a cabo el ensayo en el que el duplete se une a una superficie, de tal manera que tras la formación del duplete sobre la superficie, se pueda detectar el anticuerpo unido al duplete.

**[0190]** Se puede medir, alternativamente, la expresión génica mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos adecuados para el presente procedimiento se pueden preparar contra un polipéptido u oligopéptido de secuencia natural, o contra una secuencia exógena fusionada al ADN y que codifica un epítipo del anticuerpo específico de dicho polipéptido u oligopéptido.

## 15 **6. Purificación de la proteína**

**[0191]** Los polipéptidos se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células hospedadoras. Si están unidos a membrana, se pueden liberar de la membrana usando una disolución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anterior se pueden perturbar mediante diversos medios físicos o químicos, tales como criocongelación, ciclación, sonicación, perturbación mecánica, o agentes de lisis celular.

**[0192]** Puede ser deseable purificar el anterior a partir de las proteínas o polipéptidos de célula recombinantes. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de los procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol; HPLC en fase inversa cromatografía en gel de sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, columnas de Sephadex G-75, proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes metálicas para unir las formas etiquetadas a epítopos de las moléculas deseadas. Se pueden emplear diversos procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del anticuerpo, polipéptido u oligopéptido concreto producido por los procedimientos reivindicados.

**[0193]** Cuando se usan técnicas recombinante, se puede producir el polipéptido de LY6 intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si dichas moléculas se producen intracelularmente, como una primera etapa, el desecho particulado, tanto de las células hospedadoras como de los fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. De manera breve, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA, y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares se pueden retirar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en primer lugar generalmente usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

**[0194]** La purificación se puede producir usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuabilidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de las especies y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. Se puede usar la proteína A para purificar los anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  (Lindmark y col., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para las  $\gamma 3$  humanas (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual el ligando de afinidad se une es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como las de vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinilo)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que se pueden conseguir con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio  $C_H3$ , la resina Bakerbond ABXJ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Están también disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas

tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC en Fase Inversa, la cromatografía en gel de sílice, la cromatografía en heparina SEFAROSAJ, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), la cromatofocalización, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

5

**[0195]** Tras cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, llevada a cabo preferiblemente a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

10

#### **H. Formulaciones farmacéuticas**

**[0196]** Las formulaciones terapéuticas ("agente terapéutico" usadas de acuerdo con la presente invención se pueden preparar para el almacenamiento mezclando el(los) agente(s) terapéutico(s) que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science of Practice of Pharmacy, 20ª edición, Gennaro, A. y col., Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio), cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA, tonificantes tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivos tales como polisorbato; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos de Zn-proteínas); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN7, PLURONICS7 o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferiblemente entre 10-100 mg/ml.

**[0197]** Las formulaciones de la presente memoria descriptiva pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además del(de los) agente(s) terapéutico(s) anterior(es), puede ser deseable incluir en la formulación, un anticuerpo adicional, *por ejemplo*, un segundo agente terapéutico mencionado, o un anticuerpo para alguna otra diana tal como el factor de crecimiento que afecta el crecimiento del glioma. Alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

**[0198]** Los ingredientes activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de polimetacrilato de metilo, respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, *más arriba*.

**[0199]** Se pueden preparar preparaciones de liberación continua. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, polimetacrilato de 2-hidroxietilo, o alcohol poli(vinílico), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT7 (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

**[0200]** Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

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

**[0201]** Para determinar la expresión de LY6 en el tejido o las células gastrointestinales de un mamífero, tal como un mamífero que experimenta la IBD, están disponibles diversos ensayos diagnósticos. En una realización, se puede analizar la expresión en exceso del polipéptido de LY6 mediante la RT-PCR, la hibridación in situ, el análisis de micromatriz, y/o la inmunohistoquímica (IHC). Secciones de tejido incluidas en parafina reciente y/o congelada procedentes de una biopsia gastrointestinal (tal como de colon o, más específicamente, del colon sigmoideo) de un mamífero (tal como, sin limitación, un ser humano) se pueden someter a la RT-PCR, la hibridación in situ, el análisis de micromatriz y o el ensayo IHC.

**[0202]** Alternativa o, adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos FISH tales como INFORM7 (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION7 (Vysis, Illinois) en formalina fijada, tejido incluido en parafina para determinar la extensión (si acaso) de la expresión de LY6 y/o la regulación en exceso en una muestra o biopsia de tejido.

**[0203]** Se puede evaluar la expresión de LY6 usando un ensayo diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica) que se une a la molécula que se va a detectar y se etiqueta con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o un marcador fluorescente) y se hace un barrido externo al paciente para la localización del marcador.

**[0204]** Actualmente, dependiendo de la etapa de la IBD, el tratamiento implica una terapia o una combinación de las siguientes terapias, cirugía para eliminar el tejido del intestino afectado, administración de agentes terapéuticos, incluyendo sin limitación la quimioterapia, cambios en la dieta, y una gestión del estilo de vida: Se conocen en la técnica los agentes terapéuticos o los agentes quimioterapéuticos útiles en el tratamiento de la IBD y se dan a conocer en la presente memoria descriptiva los agentes terapéuticos y quimioterapéuticos representativos

**[0205]** En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y los derivados modificados (véase, por ejemplo, el documento EP0600517). El anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica anterior se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. En otra realización, dicho anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica se administra junto con la quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. Las Physicians Desk Reference (PDR) dan a conocer las dosificaciones de estos agentes que se han usado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer concreto que se está tratando, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para el profesional experto en la técnica y se pueden determinar por el médico.

**[0206]** Los agentes terapéuticos o los agentes quimioterapéuticos se administran a un paciente humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intracraneal, intracerebroespinal, intraarticular, intratecal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, oral, tópica, o de inhalación.

**[0207]** La presente invención da a conocer procedimientos que implican una etapa diagnóstica y una etapa de tratamiento terapéutico. En una realización, la presente invención proporciona procedimientos para detectar la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) en un sujeto mamífero que incluyen las etapas de (1) detectar el nivel de expresión de un ácido nucleico o de un gen que codifica un polipéptido de LY6 (a) en una muestra de ensayo de tejido o células obtenidas del sujeto, y (b) en una muestra del control en la que un nivel mayor de expresión del ácido nucleico o del gen de LY6 en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra del control, indica la presencia de una IBD en el sujeto a partir del cual se obtuvo la muestra de ensayo; y (2) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico para IBD. En una realización, el agente terapéutico para IBD es un antagonista de otra molécula asociada con IBD. La presente invención contempla varias moléculas asociadas con IBD que se expresan de manera diferente en IBD. En otra realización, la molécula asociada con IBD se sobreexpresa en una IBD. En otra realización, la molécula asociada con IBD sobreexpresada es una integrina. En otra realización, la molécula asociada con IBD es integrina, beta 7 (ITGB2) (véase el documento 2006/026759). El término "agente terapéutico para IBD" tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un antagonista de una molécula asociada con la IBD. En una realización, el agente terapéutico para IBD es un antagonista de una integrina. En otra realización, el agente terapéutico para IBD es un antagonista de ITGB7. En otra realización, el agente terapéutico para IBD es un antagonista del polipéptido que se muestra como SEQ ID NO: 69 codificado por la secuencia de ácido nucleico que se muestra como SEQ ID NO: 68.

**J. Artículos de fabricación y kits**

**[0208]** Para las aplicaciones diagnósticas, el artículo de la fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente que indica un uso para la detección y la expresión de LY6 (tal como, sin limitación LY6, LYPD1, LYPD3, y/o LYPD5) en un tejido o célula gastrointestinal de un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano. En una realización, el tejido o la célula es un tejido o una célula gastrointestinal. En una realización, la detección incluye la cuantificación respecto a una muestra del control. En una realización, el recipiente, etiqueta o prospecto indica que el tejido o las células gastrointestinales son del colon de un mamífero. En una realización, el recipiente, la etiqueta o el prospecto indican que la expresión creciente de LY6 con respecto a una muestra del control es indicadora de la IBD, incluyendo, sin limitación la CD y/o la UC, en el mamífero. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. Adicionalmente, el artículo de la fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón u otro reactivo (tal como un marcador detectable) útil para llevar a cabo la detección. Este puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, y colorantes.

**[0209]** Para el aislamiento y la purificación del polipéptido de LY6, el kit puede contener el reactivo de unión a LY6 acoplado a perlas (*por ejemplo*, perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar kits que contienen dichas moléculas para la detección y la cuantificación del polipéptido de LY6 *in vitro*, *por ejemplo*, en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de la fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociada con el recipiente El recipiente mantiene una composición que comprende al menos uno de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica de unión a LY6 utilizable con la invención. Se pueden incluir recipientes adicionales que contengan, *por ejemplo*, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como las instrucciones para el uso previsto *in vitro* o diagnóstico.

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

**[0210]** Las moléculas que se esperaría que se unieran a los ácidos nucleicos que codifican un gen LY6 incluyen oligonucleótidos de sentido directo y de sentido contrario, que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (tanto ARN como ADN) capaz de unirse a las secuencias diana de ARNm o ADN de LY6. Los oligonucleótidos de sentido contrario o de sentido directo, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región de codificación del ADN de LY6 o su complemento: La capacidad para derivar un oligonucleótido de sentido contrario o de sentido directo, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48: 2659, 1988) y van der Krol y col. (BioTechniques 6: 958, 1988).

**[0211]** Los oligonucleótidos de sentido directo y/o de sentido contrario hibridables a un gen LY6 son útiles, por ejemplo, para detectar la presencia de ADN o ARNm de LY6 en una muestra de tejido o células gastrointestinales de un mamífero de acuerdo con la invención. Los compuestos de sentido directo y/o de sentido contrario usados de acuerdo con esta invención se pueden preparar de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se adquiere de diversos suministradores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede emplear de manera adicional o alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados. Los compuestos de la presente invención pueden también premezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra forma con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes que enseñan la preparación de dicha captación, distribución y/o absorción, ayudando a las formulaciones incluyen, pero no se limitan a, Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

**[0212]** Los oligonucleótidos de sentido directo y sentido contrario incluyen sin limitación los cebadores y sondas útiles en la PCR, RT-PCR, procedimientos de hibridación, hibridación *in situ*, y similares.

**[0213]** Otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido directo o sentido contrario incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO

90/10048, y otros restos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tales como poli-(L-lisina). Aún más, se pueden añadir agentes intercalantes tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a los oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido de sentido contrario o de sentido directo para la secuencia del nucleótido diana.

**[0214]** Las moléculas de ARN o ADN de sentido contrario o sentido directo son generalmente al menos aproximadamente de 5 nucleótidos de longitud, de manera alternativa al menos aproximadamente de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos un 10 % de la longitud de referencia.

### **EJEMPLOS**

**[0215]** Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan con objetivos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Reactivos comercialmente disponibles denominados como en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indique otra cosa. La fuente de las líneas celulares se identificó en los siguientes ejemplos, y/o a lo largo de la memoria descriptiva, mediante los números de acceso de la ATCC que es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

#### **Ejemplo 1: Materiales y procedimientos**

**[0216]** *Reactivos, células y ratones:* se obtuvieron IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , e IL1 $\beta$  de Peprotech™ (Rocky Hill, NJ). Se obtuvo IFN $\alpha$  de Hycult Biotechnology™ (Países Bajos). Para los experimentos de reticulación, se obtuvieron el anticuerpo dirigido contra el control de KLH, y anti LY6A (clon E13-161.7 o D7) de Pharmingen™ (San Diego, CA). Se obtuvo anti-LY6C (clon HK1.4) de Southern Biotech™ (Birmingham, AL).

**[0217]** Se indujo la colitis crónica mediante transferencia de CD45RB<sup>high</sup> tal como se ha descrito anteriormente en ratones SCID en un fondo Balb/c (Powrie, F. y col., (1994) Immunity 1:553-562). Ratones IL10<sup>-/-</sup> (Kuhn, R. y col., (1993) Cell 75: 263-274) sobre 129 fondos, que desarrollan colitis espontánea, se sacrificaron a entre 11 y 13 semanas de edad. Los colonos se congelaron rápidamente en OCT hasta que se usaron en los experimentos tal como se ha descrito. El colon proximal, el colon medio, el colon distal y el recto se puntuaron usando una escala de 0-5 (0 = intestino normal, 5 = enfermedad grave). Se sumaron las puntuaciones para conseguir una puntuación total de gravedad de la colitis para cada animal.

**[0218]** Se derivó la línea celular de colonocitos de ratón adulto joven (YAMC) (proporcionada por Robert Whitehead, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN) del Immortomouse™, un animal transgénico que contenía un antígeno T sensible a la temperatura (tsTag) bajo el control de un promotor dependiente del interferón  $\gamma$ , tal como se ha descrito anteriormente (Whitehead, R.H. y col, (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90 :587-591). Las células YAMC proliferan en condiciones permisivas de 32 °C en presencia de 5 unidades/ml de IFN-7 (Peprotech™, New Jersey), pero no proliferan más tras la retirada de IFN  $\gamma$  a 37 °C (condiciones no permisivas).

**[0219]** Las células YAMC se cultivaron en RPMI que contenía FBS al 5 %, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomycin, 5 U/ml de IFN  $\gamma$  y suplemento N-2 (Invitrogen™, Carlsbad, CA). Se cultivaron las células en condiciones no permisivas durante 24 horas antes de los experimentos, y durante la duración de la experimentación.

**[0220]** Se obtuvieron células CMT93 de la ATCC (Número ATCC®, CCL-223™, ATCC, Manassas, VA) cultivadas en DMEM que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, y penicilina/estreptomycin.

**[0221]** *Microscopio de captura láser y purificación del ARN:* se aplicaron secciones de 10-12  $\mu$ m a portas con membrana LCM (Molecular Machines™, Glattbrugg, Suiza). Se sometieron los portas a una tinción H&E abreviada (tiempo total de aproximadamente cinco minutos) antes de que se identificaran histológicamente las células epiteliales de la cripta y se diseccionaron usando un microscopio MMI Cellcut™ (Molecular Machines™, Glattbrugg,

Suiza). Se purificó el ARN a partir de las células diseccionadas usando el kit de purificación del ARN Arcturus™ Picopure y los protocolos del fabricante (Arcturus™, Sunnyvale, CA) y se cuantificó usando el Espectrofotómetro™ NanoDrop ND-1000™ (NanoDrop Technologies™, Wilmington, DE).

5 **[0222]** Hibridación de micromatriz y análisis de datos: Se determinó la cantidad y la calidad de la entrada de muestras de ARN total usando un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop™ Technologies, Montchanin, DE) y Bioanalyzer 2100™ (Agilent™ Technologies, Palo Alto, CA), respectivamente. Agilent™ Technologies (Palo Alto, CA) proporcionó el procedimiento de preparación del ARNc marcado con colorante Cy y la hibridación de la matriz. De manera breve, la muestra de ARN total se convirtió en ADNc bicatenario y a continuación en ARN marcado  
 10 usando un Kit Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification™ (Agilent™, Product nº 5184-3523). El ARNc marcado se purificó usando el mini kit RNeasy™ (Qiagen™, San Diego, CA) y a continuación se cuantificó usando el espectrofotómetro ND-1000™ (Nanodrop™ Technologies). Se determinó la incorporación del colorante Cy haciendo avanzar el ARNc marcado en un gel de TBE-Urea Novex™ (Invitrogen™, Carlsbad, CA) seguido por el barrido del gel en un escáner Typhoon™ (GE Healthcare™, Piscataway, NJ). Para determinar la cantidad de cuentas  
 15 fluorescentes del colorante Cy, se analizaron las imágenes del gel usando el software ImageQuant™ (GE Healthcare™). Aproximadamente, 500.000 cuentas del ARNc marcado con el colorante Cy se fragmentaron y se hibridaron con la matriz del genoma completo de ratón de Agilent tal como se describe en el Kit-plus de Hibridación In situ de Agilent (Agilent™, Product nº 5184-3568). Las muestra de LCM se marcaron con colorante Cy5 y se hibridaron frente a la referencia de ratón universal marcado con el colorante Cy3 (Stratagene™, La Jolla, CA). Tras  
 20 la hibridación, se lavaron las matrices, se secaron con acetónitrilo, y se barrieron en el escáner de micromatriz del ADN de Agilent™. Se analizaron los archivos de imágenes de la matriz usando la versión 7.5 del software Feature Extraction™ de Agilent™ y se llevó a cabo un análisis de datos adicional usando Resolver™ (Merck™, Seattle, WA).

**[0223]** Se analizaron los datos usando el software Rosetta Resolver™ (Rosetta Biosoftware™, Seattle, WA).  
 25 De Δmanera breve, se agruparon las muestras sanas y colíticas por separado y se seleccionaron sondas que pasaron dos Anova personalizados (p<0,05). Estas sondas se analizaron adicionalmente para las sondas que demostraron un cambio de dos veces o más en las muestras colíticas frente a las muestras sanas.

**[0224]** *RT-PCR cuantitativa en tiempo real:* se llevó a cabo la RT-PCR sobre ARN extraído usando el kit y los  
 30 reactivos Taqman™ Gold™ RT-PCR (Applied Biosystems™, Foster City, CA). Todas las muestras se hicieron avanzar con cebadores específicos del gen usando sondas internas marcadas con 5'-FAM y 3'-TAMRA. Se llevó a cabo el análisis en comparación con el gen doméstico, SPF32, cebadores específicos mediante el procedimiento 2-<sup>ΔΔ</sup>Ct tal como se describe (Livak, K.J., y T.D. Schmittgen (2001) Methods 25: 402-408). Los cebadores y las sondas se diseñaron usando tanto el software Primer3™ (Rozen, S., y H. Skaletsky (2000) Methods Mol Biol 132: 365-386)  
 35 como se obtuvieron comercialmente (Applied Biosystems™). Los cebadores y las sondas usados para estos ensayos fueron los siguientes, que se muestran en la dirección 5'-3'.

LY6A

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

LY6C

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

50 **[0225]** *Tinción inmunofluorescente:* Tejidos congelados se cortaron en secciones de 5 μm y se tiñeron con anti LY6C biotinilado (Southern Biotech™, Birmingham, AL) o anti-SCA-a a 2,5 ng/ml (R&D Systems™, Minneapolis, MN). Se lavaron los portas y se marcaron con Alexa Fluor™ 488 y se conjugaron, se montaron usando Prolong Gold™ con DAPI (Invitrogen™, Carlsbad, CA) y se visualizaron mediante microscopio confocal.

55 **[0226]** *Moléculas de LY6 reticulantes:* Se probó la capacidad del polipéptido de LY6 reticulado para efectuar la producción de quimiocina incubando células YAMC con anticuerpos dirigidos contra LY6c o contra KLH (control) unidos a placa y midiendo la producción de quimiocinas CXCL2, CXCL5, y CCL7. Debido a que se requiere la formación de una balsa lipídica en la membrana celular para la reticulación, se probó la producción de quimiocina en condiciones normales de formación de la balsa lipídica (sin agotamiento del colesterol) y en condiciones de

agotamiento del colesterol.

**[0227]** Para la reticulación usando anticuerpos unidos a placa, se añadieron 100 µl de anticuerpo dirigido contra LY6C i contra KLH (control) a 5 µg/ml de concentración a una placa de 96 pocillos, o se añadieron 2 ml a una placa de 60 mm<sup>2</sup> y se dejó que se unieran a la placa durante 15 horas a 4 °C. Se incubaron células YAMC, que crecían en condiciones de agotamiento de colesterol o sin agotamiento del mismo (tal como se proporciona en el Ejemplo 5, en la presente memoria descriptiva), con los anticuerpos unidos a placa durante 15 horas a 32 °C en condiciones sin agotamiento del colesterol. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7. Se describe el ensayo adicionalmente y se muestran los resultados en el Ejemplo 5, en la presente memoria descriptiva.

**[0228]** *Inhibición del ARNip:* Se obtuvo ARNip individual dirigido contra LY6C de murino de Dharmacon (Lafayette, CO). El ARNip se transfectó en células YAMC usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) y protocolos normalizados. 72 horas después de la transfección, se recogieron las células para determinar la eficacia de desactivación. Se seleccionó un ARNip para los experimentos de reticulación basándose en la superior eficacia de desactivación (95 % de inhibición mediante RT-PCR)

**[0229]** *Secreción de CXCL5:* Se recogieron los sobrenadantes y en el punto temporal indicado de las células estimuladas se determinaron las concentraciones de citocina y CXCL5 mediante ELISA usando un kit comercialmente disponible de R&D Systems™ y los protocolos del fabricante. El nivel de detección fue de 15 pg/ml de CXCL5.

**[0230]** *Agotamiento del colesterol:* Se cultivaron células YAMC durante 72 horas en medio exento de suero a 37 °C en presencia de lovastatina 4 µM y mevalonato 250 µM (Sigma). Se plaquearon las células y se mantuvieron en lovastatina y mevalonato a lo largo del experimento.

**[0231]** Estadística: Se usó el test de la t de Student para la comparación entre grupos (\* indica p<0,05)

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

**[0232]** Los estudios han indicado que los modelos de expresión génica de las IEC están significativamente alterados en modelos de colitis en ratón, así como en la IBD humana (Fahlgren, A., y col. (2004) Clin Exp Immunol 137: 379-385; Brand, S. y col. (2006) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G827-838; Ruiz, P.A. y col. (2005) J Immunol 174: 2990-2999). En este ejemplo, se los modelos de expresión génica evaluados en IEC de ratones sanos y colíticos se examinaron con el fin de iluminar novedosos genes y rutas alteradas en la IBD.

**[0233]** La identificación de los genes implicados en la inmunopatología de la IBD se investigó evaluando la células epiteliales intestinales (IEC) del modelo de colitis en ratón por transferencia de linfocitos T CD45RB<sup>HI</sup> así como el modelo IL10<sup>-/-</sup> de ratón, ambos de los cuales dan como resultado la desregulación de Th1 y compartes muchas características de la enfermedad de Crohn (Elson, C.O. y col. (2005) Immunol Rev 206: 260-276; Bouma, G., y W. Strober (2003) Nat Rev Immunol 3: 521-533). Se usó la microdissección mediante captura laser (LCM) para aislar las IEC de la cripta de los cólonos de ratones sanos y colíticos en los dos modelos de la IBD de murino. Se extrajo el ARN de estas muestras y se analizó mediante tecnología de micromatriz tal como se describe en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 1. El perfil de la expresión génica de las IEC de ratones colíticos en el modelo de colitis por transferencia identificó 1770 sondas con cambios de expresión > 2 veces en comparación con los ratones del control, mientras que el modelo IL10<sup>-/-</sup> identificó 1140 sondas. El solapamiento en ambos modelos dio como resultado 540 sondas con cambios de expresión > 2 veces, correspondientes a aproximadamente 400 genes diferentes (no se muestran los datos).

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

**[0234]** De los aproximadamente 400 genes afectados en ambos modelos, los genes implicados en la presentación del antígeno, la señalización de TLR y la migración celular estaban representados en exceso (Tabla 7). En la Tabla 7, los números representan el promedio con la desviación estándar del cambio de veces en comparación con el ARN patrón universal de los ratones colíticos sobre los ratones sanos en cualquiera del modelo IL10<sup>-/-</sup> de colitis o del modelo CD45RB<sup>HI</sup> de colitis, tal como se indicó. Los resultados indicaron que algunos genes que expresaron las IEC mostraron modelos de expresión alterados en modelos de murino de la IBD. Muchos de estos genes, incluyendo TLR2, CCL7, CXCL5 e ICAM-1 se han descrito anteriormente como teniendo una creciente expresión epitelial durante la colitis (Breider, M.A. y col. (1997) Vet Pathol 34: 598-604; Ugucioni, M. y col. (1999)



Am J Pathol 155: 331-336; Z'Graggen, K. y col. (1997) Gastroenterology 113: 808-816; Singh, J.C. y col. (2005) Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288: G514-524), lo que sugiere que el modelo de expresión génica obtenido es estas micromatrices es una reflexión precisa de la biología de las IEC en colitis.

5

Tabla 7

Cambio de veces (valor p):		
Migración celular	Modelo IL10-/-	Modelo CD45RBhi
CXCL1	+ 3,89 (<0,0001)	+ 2,09 (0,00066)
CXCL5	+ 21,82 (<0,0001)	+ 23,34 (<0,0001)
CXCL13	+ 3,01 (<0,0001)	+ 2,85 (<0,0001)
CCL6	- 3,47 (<0,0001)	- 2,5 (<0,0001)
CCL7	+ 4,2 (<0,0001)	+ 5,54 (0,00026)
CCL11	- 3,43 (<0,0001)	- 3,6 (0,00607)
<b>Señalización de TRL</b>		
TLR2	+ 2,15 (<0,0001)	+ 2,68 (<0,0001)
Fos	+ 3,64 (<0,0001)	+ 2,03 (<0,0001)
LBP	+ 2,34 (<0,0001)	+ 2,57 (<0,0001)
NFKBIA	+ 2,37 (<0,0001)	+ 2,15 (<0,0001)
<b>Presentación del antígeno</b>		
H2-D1	+ 2,77 (<0,0001)	+ 2,23 (<0,0001)
HLA-A	+ 2,83 (<0,0001)	+ 2,40 (<0,0001)
HLA-B	+ 2,71 (<0,0001)	+ 2,44 (<0,0001)
HLA-E	+ 2,3 (<0,0001)	+ 2,34 (<0,0001)
ICAM-1	+ 2,51 (<0,0001)	+ 2,587 (<0,0001)
PSMB8	+ 8,10 (<0,0001)	+ 3,09 (<0,0001)
PSMB9	+ 6,61 (<0,0001)	+ 2,72 (<0,0001)
TAP 1	+ 4,05 (<0,0001)	+ 4,10 (<0,0001)
TAP2	+ 2,08 (<0,0001)	+ 2,18 (<0,0001)

**[0235]** Las IEC pueden funcionar como APC no profesionales (Snoeck, V. y col., (2005) Microbes Infect 7: 997-1004; y Shao, L y col., (2005) Immunol Rev 206: 160-176), y el modelo de expresión génica obtenido en estas micromatrices indica que estas funciones están potenciadas durante la colitis mediante la regulación en exceso en los genes asociados con el procesamiento del antígeno, tales como LMP7 y TAP1, así como en los genes MHC de clase I y II que servirían para potenciar la presentación de antígenos en la superficie de las IEC.

**[0236]** Los datos de la micromatriz apoyan el concepto de que las IEC atraen las células inmunes del colon mediante la expresión alterada de la quimiocina, y pueden presentar el antígeno a los linfocitos T infiltradores regulando en exceso la expresión de los genes asociados con la presentación del antígeno.

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

**[0237]** Los miembros de la familia de moléculas de LY6 de ratón se sobrerrepresentaron en el número así como en el grado de regulación en exceso en el modelo de colitis por transferencia en ratón y en el modelo IL10-/- de ratón (Figuras 23A y 23B). Estos resultados se confirmaron mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real del ARN de IEC combinado y amplificado en el modelo de colitis por transferencia (no se muestran los datos). La expresión de los miembros de la familia LY6 fue única para el estado de enfermedad, de tal manera que no se expresaron de niveles apreciables de ratones sanos de cualquiera de estos miembros de la familia LY6.

**[0238]** Aunque se conoce la expresión de moléculas LY6 de murino en la superficie de las células de origen hematopoyético, no se ha descrito anteriormente la expresión en las IEC (Bamezai, A. (2004) Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 52: 255-266; y Rock, K.L. y col. (1989) Immunol Rev 111: 195-224). La expresión de LY6A y LY6C de murino es detectable en muchas células no epiteliales presentes en el interior del colon, tales como los linfocitos T y los granulocitos. Se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente de LY6A y LY6C de murino en colonos sanos y

colíticos. Los niveles de LY6A y LY6C de murino fueron mínimos o ausentes sobre la superficie de las IEC sanas (Figura 24A y 24C respectivamente). La expresión de LY6A y LY6C fue detectable sobre la superficie de las IEC en los cólores de los ratones colíticos (Figura 24B y 24D, respectivamente). No hubo evidencia de polarización tanto de LY6A como de LY6C, y la tinción estuvo presente en las membranas apicales y basolaterales, volviendo a las moléculas de LY6 potencialmente accesibles a los ligandos sobre cualquier superficie. Estos resultados indican que los resultados del análisis de micromatriz muestran una regulación en exceso de LY6A y LY6C de murino en modelos colíticos de murino que no se debió a la influencia de la contaminación de las células inmunes.

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

10

**[0239]** Se indujo la expresión de LY6 e linfocitos T y se potenció por los IFN de tipo I y tipo II (Khodadoust, M.M., K.D. Khan, y A.L. Bothwell. 1999. Complex regulation of Ly-6E gene transcription in T cells by IFNs. *J Immunol* 163: 811-819). Además, la expresión de numerosas citocinas, se elevó en el colon durante la colitis activa (Niessner, M., and B.A. Volk. 1995. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101: 428-435).

15

**[0240]** Para determinar si las citocinas presentes durante la colitis afecta la transcripción de los miembros de la familia LY6 en las IEC, los inventores trataron células YAMC, una línea IEC de murino inmortalizada condicionalmente, con IL-1 $\beta$ , IFN $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  o la combinación de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  y se analizó la transcripción de todos los genes LY6 de murino identificados mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Tabla 8). De manera breve, se determinaron los niveles de ARNm del miembro indicado de la familia IEC en las IEC mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real después de 15 horas de tratamiento con la citocina indicada. El número representa el cambio de veces (determinado mediante el procedimiento  $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) frente a los medios del control sin tratar. \*, P<0,05 frente a los medios del control. †, p<0,05 frente a las células tratadas con IFN $\gamma$ . Se probaron los siguientes miembros de la familia LY6, pero no se detectaron en las muestras, con respecto al tratamiento: LY6K, Lypd3, Lypd4, Lypd5, LY6g5b, Ly6g6d, Ly6g6e, Slurp1. Los resultados indican que los miembros de la familia LY6 regulan en exceso las IEC en respuesta a las citocinas inflamatorias.

20

Tabla 8

	Medios	IL1 $\beta$	TNF $\alpha$	IFN $\alpha$	IFN $\gamma$	IFN $\gamma$ y TNF $\alpha$
<b>Lv6A</b>	1,0	1,8*	2,2*	2,8*	33,1*	65,4*†
<b>Ly6C</b>	1,0	1,6*	1,2*	2,4*	65,6*	63,6*
<b>Lv6D</b>	1,0	2,7*	2,1*	1,5*	1,0	0,9
<b>Lv6E</b>	1,0	1,4*	1,5*	2,1*	1,9*	2,9*†
<b>Lv6F</b>	1,0	2,5*	0,6*	7,1*	108,2*	169,7*†
<b>Ly6H</b>	1,0	1,0	1,1	1,2	3,7*	1,4†
<b>Lypd1</b>	1,0	1,5*	2,1*	1,3*	1,3*	2,9*†
<b>Lypd2</b>	1,0	0,1*	ND	0,4*	0,1*	ND
<b>Ly6g5c</b>	1,1	1,3	0,8	0,9	1,3	1,1
<b>Ly6g6c</b>	1,0	0,7	0,7	0,6	0,6*	0,3*†
<b>Slurp2/Lynx1</b>	1,1	0,7	0,4	0,7	1,5	0,4*

**[0241]** Aunque muchos de los miembros de la familia LY6 no se detectaron tanto en presencia como en ausencia de citocinas inflamatorias, los inventores detectaron una fuerte regulación en exceso en la transcripción de LY6A, LY6C y LY6F de murino en respuesta a la mayoría de citocinas ensayadas, así como una regulación en exceso más moderada de LY6E, LY6H y LYPD1 de murino en respuesta a algunas de las citocinas ensayadas. Sin embargo, IFN $\gamma$  fue de lejos la citocina más potente en la inducción de la regulación en exceso de LY6. Además TNF $\alpha$  potenció los efectos de IFN $\gamma$  sobre la expresión de LY6A, LY6F, LY6E y LYPD1. Se observó una regulación en exceso similar de los miembros de la familia LY6 en otra línea de IEC de murino, CMT93 (no se muestran los datos).

**[0242]** Para examinar la expresión superficial de los miembros de la familia LY6 en respuesta a las citocinas, se expusieron células YAMC a las anteriores citocinas y se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de LY6A y LY6C de murino, para lo cual están disponibles anticuerpos comerciales, tal como se describe en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 1. Se expresaron niveles elevados de LY6A de murino en células YAMC incluso en ausencia de las citocinas añadidas (Figura 25B, medios). La expresión de LY6C de murino (Figura 25A, medios) fue considerablemente inferior que la expresión de LY6A.

45

**[0243]** IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  indujeron un ligero aumento en la expresión superficial de LY6A y LY6C de murino, de acuerdo con la expresión del ARN (Figuras 25A y 25B). Se señaló un aumento más moderado en la expresión cuando se añadió IFN $\alpha$  a las células, mientras que IFN $\gamma$  indujo un drástico aumento en la expresión superficial de LY6A y LY6C (Figura 25A y 25B). La expresión superficial de la proteína se asemejó estrechamente a la expresión del ARN. Las citocinas Th2, tales como IL4, IL10 o IL13 no tuvieron efecto sobre la expresión superficial tanto de LY6A como de LY6C (no se muestran los datos)

**[0244]** La inducción de LY6A (Figura 25D) y LY6C (Figura 25C) por IFN $\gamma$  fue dependiente de la dosis. Dosis tan bajas como 6,25 unidades/ml de IFN $\gamma$  dieron como resultado aumentos detectables en ambas moléculas de LY6 mediante citometría de flujo. Además, el aumento en LY6A (Figura 25F) y LY6C (Figura 25E) de la expresión superficial llegó a ser evidente entre 2 y 4 horas después del tratamiento con IFN $\gamma$ , y aumentó de manera continuada durante al menos 24 horas después del tratamiento con IFN $\gamma$ . Estos datos indican que concentraciones relativamente bajas de IFN $\gamma$  son suficientes para aumentar la expresión superficial de las moléculas de LY6 en horas.

**[0245]** Existe evidencia de que IL-22, que se secreta principalmente a partir de linfocitos T activados, funciona a través del complejo IL-22R, presente en las IEC para promover la producción de citocinas y un fenotipo inflamatorio (Brand, S.F. y col. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290: G827-838 (2006)). Además IL-22 está implicada en la inmunopatogénesis de la enfermedad de Crohn. Para examinar si IL-22 afecta a la expresión de la molécula de LY6 en IEC de murino, se cultivaron células YAMC en presencia de IL-22 y se analizaron para la expresión de LY6C (Figura 25G) y LY6A ((Figura 25H). Ambas moléculas de LY6 aumentaron sustancialmente en presencia de IL-22 a niveles comparables a la inducción que se observa tras el tratamiento con IFN $\gamma$ .

**[0246]** Para asegurar que la regulación en exceso de moléculas de LY6 no fue específica para la línea de células YAMC, se examinaron los niveles de LY6A y LY6C de murino en la línea CMT93 de células tumorales epiteliales colónicas de murino. Los niveles de LY6A de murino y LY6C de murino se regularon en exceso tras el tratamiento con IFN $\gamma$  (Figura 25I). Se piensa que los niveles de regulación en exceso de moléculas de LY6 fueron más modestos en células CMT93, el análisis de citometría de flujo indicó que los niveles fueron bastante elevados incluso en células sin tratar (no se muestran los datos), que es probablemente un resultado del fenotipo tumoral de las células CMT93.

**[0247]** Estos datos apoyan los datos obtenidos mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real en la confirmación de que los miembros de la familia LY6 regulan en exceso las IEC en respuesta a las citocinas inflamatorias.

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

**[0248]** A diferencia de las proteínas ancladas a GPI, los miembros de la familia LY6 no poseen un único dominio intracelular asociado con una señalización tradicional exterior-interior. Más bien, están presentes en el interior de microdominios con balsa lipídica (Bohuslav, J. y col. Eur J Immunol 23: 825-831 (1993)). Sin embargo, se ha sugerido que la reticulación de los miembros de la familia LY6 en la superficie de las células da como resultado una redistribución de otras moléculas superficiales celulares así como la reorganización de estructuras de balsas lipídicas, lo que sugiere un mecanismo por el cual las moléculas de LY6 pueden afectar la transducción de la señal y las funciones celulares en la dirección 3'. (Simons, K. y col., Nat Rev Mol Cell Biol 1: 31-39 (2000)).

**[0249]** Se han identificado hasta la fecha pocos ligandos para las proteínas LY6, y en la actualidad no se conocen ligandos para LY6A o LY6C (Paret, C. y col., (2005) Int J Cancer 115: 724-733; Apostolopoulos, J. y col., (2000) Immunity 12: 223-232; y Classon, B.J. (2001) Trends Immunol. 22: 126-127). Se requiere colesterol para mantener la integridad de la balsa lipídica (Simons, K., y col. J Clin Invest 110: 597-603 (2002)), y se usa a menudo el agotamiento del colesterol para inhibir la biosíntesis *in vitro* de la balsa lipídica (von Tresckow, B. y col. J Immunol 172: 4324-4331 (2004)).

**[0250]** Para analizar si se produce la reorganización de la balsa lipídica en las IEC en respuesta a la reticulación de LY6, se hicieron crecer células YAMC en condiciones de agotamiento del colesterol (condiciones en las que las balsas lipídicas se agotan en las células) y en condiciones sin agotamiento del colesterol (condiciones permisivas para la formación de balsas lipídicas). Para las condiciones de agotamiento del colesterol, se hicieron crecer células YAMC en ausencia de suero y en presencia de lovastatina 4  $\mu$ M y mevalonato 0,25 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 72 horas a 37  $^{\circ}$ C. Se usaron las mismas condiciones de crecimiento para células YAMC en condiciones sin agotamiento del colesterol, excepto que no se añadieron lovastatina o mevalonato

al medio de crecimiento. A continuación las células se cambiaron de nivel y se reticuló el LY6C tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se recogió el ARN y se determinaron los niveles de expresión de CXCL2, CXCL5, y CCL7.

5 **[0251]** Los resultados de estos estudios indicaron que el agotamiento de la balsa lipídica da como resultado una inhibición de la producción de quimiocina mediada por LY6C. Las Figuras 26A-26C muestran que las células YAMC con el colesterol agotado (barras oscuras) produjeron menos quimiocina que las células que no agotaron el colesterol (barras abiertas). El agotamiento del colesterol afectó la producción de quimiocina en los grupos del control estimulados con anticuerpo dirigido contra KLH, sin tener en cuenta la estimulación del LY6C, sin embargo, 10 la respuesta fue mínima y no en una dirección consistente. Para examinar si el agotamiento del colesterol afectó globalmente la viabilidad celular, los inventores midieron la muerte celular, mediante exclusión 7AAD, y determinaron que el agotamiento del colesterol no afecta significativamente la viabilidad de las células YAMC (92 % de viabilidad frente a 86 % en las células con el colesterol agotado, no se muestran los datos). La expresión superficial de LY6A (Figura 26D) y LY6C (Figura 26E) fue significativamente inferior en las células YAMC con el colesterol agotado, 15 sugiriendo que los niveles de colesterol en la membrana plasmática y la integridad de la balsa lipídica afectan los niveles de expresión de LY6 en la superficie de las células. Estos datos sugieren que la integridad de la balsa lipídica, influenciada por la biosíntesis del colesterol, permiten la expresión de las moléculas de LY6 en la superficie, y está potencialmente implicada en la inducción de las quimiocinas mediada por LY6C. De esta manera, la potenciación de la producción de quimiocina mediada por la interacción de los polipéptidos LY6C en la membrana 20 celular requiere la presencia de balsas lipídicas sobre la superficie celular.

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

25 **[0252]** Se ha informado que la reticulación de LY6C en la superficie de los linfocitos T da como resultado la muda de LY6C (Jaakkola, I. y col. (2003) J Immunol 170: 1283-1290). Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T, cuando el LY6C de murino se reticuló en la superficie de las IEC, no se produjo la muda ni de LY6A ni de LY6C (Figura 27A y 27B, respectivamente. Por el contrario, en ausencia de IFN $\gamma$ , los niveles de expresión superficial de LY6A y LY6c aumentaron en las IEC con LY6C reticulado, pero no con LY6A. Cuando se preincubaron las IEC con 30 IFN $\gamma$ , se eliminó mucho de este efecto (Figura 27C), sin embargo, se detectó aún una ligera regulación en exceso de LY6A (Figura 27D).

**[0253]** Estos datos indican un bucle de retroalimentación positiva en el que la estimulación mediante LY6C sobre las IEC da como resultado un aumento de la expresión superficial de las moléculas de LY6.

35

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

**[0254]** No se han elucidado por completo las funciones de las moléculas de LY6. Para examinar el papel de las moléculas de LY6 en la inmunopatología de la colitis, se estudió la estimulación de las moléculas de LY6 para 40 determinar los efectos sobre la transcripción y la secreción de quimiocinas a partir de las IEC.

**[0255]** Para analizar la producción de quimiocinas a partir de las IEC en respuesta a la reticulación de moléculas de LY6 de murino, células YAMC, tanto pretratadas con IFN $\gamma$  como sin tratar, se cultivaron en placas revestidas tanto con anticuerpo control dirigido contra KLH, contra LY6A o contra LY6C. Veinticuatro horas más 45 tarde, se obtuvo el ARNm de estas células y se analizó mediante RT-PCR cuantitativa para la expresión de CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL25, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL10, CXCL12 y CX3CL1, que son las quimiocinas que se han implicado en la colitis (Tabla 9) (Papadakis, K.A. (2004) Curr Allergy Asthma Rep 4: 83-89; Banks, C. y col., (2003) J Pathol 199: 28-35; y Papadakis, K.A., y S.R. Targan (2000) Inflamm Bowel Dis 6: 303-313). Se llevó a cabo el ensayo en condiciones no permisivas de crecimiento (37 °C en ausencia de IFN $\gamma$ ) para descartar la 50 posibilidad de aumento de la proliferación de IEC en respuesta a la estimulación de IFN $\gamma$ .

Tabla 9

Pretratamiento > Reticulación >	Medios			IFN		
	Anti-KLH	Anti-LY6A	Anti-LY6C	Anti-KLH	Anti-LY6A	Anti-LY6C
CCL2	1,01 (0,14)	-1,38 (0,13)	8,81 (0,72)	3,53 (0,21)	2,83 (0,21)	16,12 (0,56)
CCL4	1,31 (1,14)	1,83 (0,49)	3,15 (1,17)	5,35 (0,48)	3,65 (0,69)	16,12 (0,56)

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

**[0256]** Las células pretratadas con IFN $\gamma$  mostraron regulación en exceso de muchos de estos genes de la quimiocina (véanse medios, grupo contra KLH, frente a IFN $\gamma$ , grupo contra KLH de la Tabla 9). Sin embargo, con la excepción de una regulación en exceso de CCL8 y una regulación en defecto de CCL1, las células YAMC 5 estimuladas contra LY6A mostraron modelos de expresión génica similares como las células YAMC estimuladas contra KLH. Sin embargo, las células YAMC estimuladas con anticuerpo dirigido contra LY6C mostraron un aumento de expresión de todas las quimiocinas analizadas excepto para CCL25, que permaneció esencialmente sin cambiar, y CXCL12, que estaba regulada en defecto en respuesta a la estimulación de LY6C. Aunque el aumento de la expresión génica de las quimiocinas inducido por la reticulación de LY6C no fue dependiente de IFN $\gamma$ , las células 10 pretratadas con IFN $\gamma$  mostraron un aumento de expresión de las quimiocinas frente a las células que no se habían pretratado con IFN $\gamma$ .

**[0257]** Para analizar la cinética de inducción de las quimiocinas inducida por la estimulación de LY6C de murino, se revistieron placas de 96 pocillos con anticuerpos dirigidos contra KLH o anticuerpos monoclonales 15 dirigidos tanto contra LY6A o LY6C. Células YAMC, tanto pretratadas con IFN $\gamma$  como no, se añadieron durante 24, 48 o 72 horas. En el punto temporal indicado se recogió el ARN para el análisis de la RT-PCR cuantitativa y se recogieron los sobrenadantes para el ELISA.

**[0258]** En 24 horas, se detectó una espiga en la transcripción de CXCL5 y CCL7 en células con LY6C 20 reticulado pero no con LY6A (Figura 28A). El aumento de expresión de CXCL5 y CCL7 disminuyó en el tiempo pero fue aún detectable después de 72 horas en el cultivo. Se piensa que no se requirió IFN $\gamma$  para potenciar la transcripción de la quimiocina, IFN $\gamma$  actuó de manera sinérgica con la estimulación de LY6C en la inducción de la transcripción de CXCL5 y CCL7 en puntos temporales tempranos.

**[0259]** En paralelo con la expresión génica, los sobrenadantes de LY6C, pero no LY6A, las células reticuladas 25 contuvieron significativamente mayores concentraciones de CXCL5 a las 48 horas (Figura 28B). el efecto fue dependiente de la dosis, y detectable con tan poco como 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo revestido dirigido contra LY6c. De manera similar a la transcripción, se potenció la secreción de CXCL5 cuando se pretrataron las células con IFN $\gamma$ , pero no se requirió IFN $\gamma$  para el efecto. Se señaló también el aumento de secreción de CXCL5 a los puntos 30 temporales de 24 y 72 horas.

**[0260]** Para asegurar que LY6C estaba implicado en la regulación en exceso observada de las quimiocinas, los inventores usaron ARNip para inactivar LY6C. El transcrito de LY6C se inhibió en un 95 % en ausencia de IFN $\gamma$  y 35 aproximadamente en un 90 % en presencia de IFN $\gamma$  mediante la RT-PCR cuantitativa en tiempo real que correspondió a niveles significativamente menores de LY6C en la superficie de las células YAMC (no se muestran los datos). Las células con niveles decrecientes de LY6C en la superficie mostraron una respuesta disminuida a la reticulación de LY6C con respecto a la transcripción de las quimiocinas (Figura 28C). La secreción de CXCL5 fue también marcadamente inhibida por la inactivación de LY6C (no se muestran los datos).

[0261] Estos resultados indican que la reticulación de LY6C, pero no de LY6A, en la superficie de las IEC da como resultado un aumento en la secreción de quimiocinas.

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

[0262] Los anteriores datos establecen un modelo en el que las IEC estimuladas mediante LY6C de murino regulan en exceso significativamente la expresión de los genes de la quimiocina.

10

[0263] El análisis de los datos de micromatriz de las IEC microdisecionadas con captura de láser en modelos de colitis en murino, se examinó la expresión de los mismos 12 genes de la quimiocina en ratones sanos y colíticos en los dos modelos de murino para determinar si las quimiocinas estimuladas por la reticulación de LY6C *in vitro* se correlacionan con las quimiocinas secretadas por la IEC *in vivo* (Figuras 29A y 29B). Se piensa que el modelo de expresión no es idéntico a la regulación en exceso de las quimiocinas resultante de la estimulación de LY6C, la expresión de CXCL5, que fue el gen de la quimiocina más altamente regulado en exceso en los estudios *in vitro*, fue también la quimiocina más regulada en exceso en modelos de colitis en murino, los inventores observaron una regulación en exceso significativa en la expresión de CXCL1, CXCL10, CCL5 y CCL7 en ambos modelos de colitis. Además, los inventores observaron la regulación en exceso de CCL4 y CCL8 en el modelo de colitis por transferencias o en el modelo IL10<sup>-/-</sup>, respectivamente

15

20

[0264] De manera interesante, la única quimiocina que se reguló en defecto como resultado de la estimulación *in vitro* de LY6C de murino, CXCL12, fue también la única de estas quimiocinas reguladas en defecto *in vivo*.

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

[0265] La expresión de LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5 humanos en una línea de células de colon humano, se examinaron células Colo 205 (una línea celular derivada de carcinoma de colon humano, ATCC<sup>TM</sup> con número de acceso CCL-222<sup>TM</sup>). Las células Colo 205 humanas se trataron con las citocinas IFN-r, LPS, TNF $\alpha$ , IFN-r + TNF $\alpha$ , IFN-r + LPS, o LPS + TNF $\alpha$  (todas a 100 ng/ml, excepto LPS a 1  $\mu$ g/ml) durante 18 horas (LYPD3) o 24 horas (LY6H o LYPD5). Se recogió y se purificó el ARN y se determinó la expresión del miembro indicado de la familia LY6 mediante la RT-PCR cuantitativa usando reactivos de Applied Biosystems<sup>TM</sup> de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y las sondas usados para el análisis de la RT-PCR fueron los siguientes:

30

35

LYPD1:

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

40

LYPD3:

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

45

LY6H:

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

50

[0266] Los cebadores y sondas de LYPD5 se adquirieron de Applied Biosystems<sup>TM</sup> (número de catálogo HS00289062\_ml).

55

[0267] Los resultados representados gráficamente en las Figuras 30A-30C indican las veces de aumento en la expresión de estos genes LY6 humanos con respecto a la B-actina humana del control. Se observaron aumentos significativos en la expresión de LY6H, LYPD3, y LYPD5 humanos tras el tratamiento con las citocinas indicadas.

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

- [0268]** Para investigar adicionalmente la fuente de aumento de expresión de LYPD1 y LYOD5 en el colon de pacientes con CD y UC, se experimentó en una cohorte de biopsias de pacientes con UC, CD y controles. El análisis de la micromatriz de la expresión de LYPD1 usando ARN extraído de biopsias de colon mostró una expresión significativamente aumentada en tejido de colon inflamado de pacientes con CD (Figura 31A). En las biopsias de UC y CD tomadas del colon, se observó una expresión de LYPD5 significativamente aumentada en pacientes con UN y CD inflamadas (Figura 31B). Esto no se observó en las biopsias no inflamadas del control.
- 10 **[0269]** Se analizó la expresión de LY6H humano en biopsias de íleo terminal de tejido de IBD inflamado con respecto a biopsias de íleo terminal del control (sin IBD) usando el análisis de la RT-PCR (Taqman™). La expresión de LY6H humano fue al menos de 1,5 veces más en las biopsias de IBD inflamadas con respecto al control.
- 15 **[0270]** La expresión de LYPD3 humano en biopsias de colon de UC inflamadas estaba regulada en exceso y era menos de 2 veces mayor en biopsias de IBD inflamadas con respecto al control.
- [0271]** Los resultados de estos ejemplos demostraron la expresión de las moléculas de LY6 en la superficie de las IEC, y además indicaron que la expresión es única en las IEC en el contexto de la inflamación. Además, los niveles de expresión superficial de LY6A y LY6C fueron altos en las IEC de ratones colíticos, y casi universales a lo largo del colon. Para las moléculas, tanto las específicas del estado de enfermedad, como las ubicuamente expresadas durante la enfermedad, la detección del gen o del polipéptido de expresión de LY6 humano, particularmente LY6H, LYPD1, LYPD3, y LYPD5 humanos, es un procedimiento útil para detectar la IBD, incluyendo la UC y/o la CD en seres humanos. Adicionalmente, el procedimiento de detección de la expresión de LY6 humano es útil para el diagnóstico de la IBD, la UC y/o la CD en un ser humano y para vigilar la respuesta de la IBD a los agentes terapéuticos.
- 20 **[0272]** En los Ejemplos dados conocer en la presente memoria descriptiva, se demostró la significación funcional de la expresión de LY6 en las IEC. Las células YAMC fueron muy positivas para LY6A, y expresaron niveles inferiores de LY6C. Sin embargo, tras la estimulación con numerosas citocinas presentes en el interior del colon durante la colitis, incluyendo IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , y en particular IL-22 e IFN $\gamma$ , los niveles de expresión de ambas moléculas de LY6 se potenciaron mucho. Las células YAMC pretratadas con IFN $\gamma$  para regular en exceso la expresión de las moléculas de LY6, fueron un útil modelo *in vitro* para analizar la significación funcional de la expresión de LY6
- 30 **[0273]** La naturaleza condicionalmente inmortalizada de las células YAMC se formula a partir de la expresión que impulsa el promotor MHCII del antígeno T grande de SV40; se usaron bajos niveles (2,5-5 U/ml) de IFN $\gamma$  para impulsar la proliferación de estas células (Whitehead, R.H. y col. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90: 587-591; Whitehead, R.H., y J.L. Joseph. (1994) Epithelial Cell Biol 3: 119-125). Las células YAMC se usan a menudo como un modelo *in vitro* para los tratamientos de citocinas de las IEC de murino (Mei, J.M. y col. (2000) Faseb J 14: 1188-1201; Yan, F., y D.B. Polk (2002) J Biol Chem 277: 50959-50965). El antígeno T grande de SV40 que contenían estas células es sensible a la temperatura, y no funcional a 37 °C. todos los experimentos llevados a cabo en la presente memoria descriptiva implicaron el tratamiento con IFN $\gamma$  en estas condiciones no permisivas. Además las células YAMC se malnutrieron de suero (y no se les suministró IFN $\gamma$ ) a 37 °C durante 24 horas antes de los experimentos. En dichas condiciones, no se observaron los efectos que indicaban la expresión residual del antígeno
- 45 T, tales como la proliferación de células. Como resultado, los efectos del tratamiento con IFN $\gamma$  fueron debidos a los efectos inherentes de IFN $\gamma$  más bien que a los efectos derivados de la impulsión de la expresión del antígeno T. Además, se detectó la regulación en exceso de los miembros de la familia LY6 en una segunda línea de células de murino, CMT93, confirmando que este efecto es ampliamente aplicable a las IEC.
- 50 **[0274]** Además, se señaló que tras el tratamiento con TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e, IL-22, IFN $\gamma$  no fue única entre las citocinas en la inducción de las moléculas de LY6 como una regulación modesta de la expresión de LY6. La regulación en exceso de las moléculas de LY6 en la IEC en respuesta a IL-22 es interesante a la luz de recientes datos que demuestra un potencial papel de IL-22 en la Enfermedad de Crohn (Wolk, K., y col. J Immunol 178: 5973-5981 (2007)). Aunque que la homología entre moléculas de LY6 de ratón y ser humano es a menudo complicada,
- 55 existen evidencias que sugieren que la regulación en exceso de las moléculas de LY6 no está restringida a ratones. Estudios previos en ratas han sugerido la regulación en exceso de las moléculas de LY6 en el intestino delgado en modelos de colitis, y se ha sugerido que dicha expresión está implicada en la inflamación, las interacciones célula/célula así como la señalización en el interior de las IEC de rata (Baksheev, L. y col. J Gastroenterol 41: 1041-

1052 (2006)).

**[0275]** Los datos descritos anteriormente indican que existe una posibilidad de que la integridad de la balsa lipídica esté implicada en la transducción de la señal mediada por LY6C en las IEC. Esto implica que la perturbación de las balsas lipídicas puede servir para atenuar los efectos en la dirección 3' de la estimulación de LY6C tanto regulando en defecto la expresión de LY6C como perturbando los componentes estructurales de la señalización de LY6C. Recientemente, se ha determinado que el agotamiento del colesterol de las IEC con estatinas inhibe la expresión proinflamatoria del gen a través de la modulación de NF- $\kappa$ B (Lee, J. y col., *Int Immunopharmacol* 7: 241-248 (2007)). Además, las estatinas han sido eficaces agentes terapéuticos en los modelos de colitis en murino (Naito, Y., y col. *Int J Mol Med* 17: 997-1004 (2006)). El mecanismo que conecta la motilidad de la balsa lipídica y el bloqueo de NF- $\kappa$ B permanece sin determinar, pero los datos de los inventores sugieren que la activación mediante LY6C podría ser una hipótesis que explicara el mecanismo de acción.

**[0276]** En este estudio, los inventores identificaron moléculas de LY6 como un interruptor potencial en la dirección 5' en la expresión de los genes de la quimiocina. La reticulación del receptor de LY6C con anticuerpos monoclonales dio como resultado una regulación en exceso drástica de casi todas las quimiocinas analizadas, incluyendo CXCL5. Los inventores confirmaron adicionalmente que la secreción de CXCL5 está muy potenciada en las IEC reticuladas de LY6C. Es interesante que incluso aunque LY6A y LY6C están anclados a la superficie celular por un resto GPI, y a pesar de los mayores niveles de expresión de LY6A que de LY6C sobre la superficie de las IEC, se observó que los efectos de la secreción de quimiocinas en la dirección 3' con la reticulación de LY6C no fueron consistentes con la reticulación de LY6A.

#### **Ejemplo 11: Identificación de un ligando de LYPD5**

**[0277]** En este estudio, se llevó a cabo una búsqueda de los ligandos de LYPD5 mediante las técnicas bien conocidas por las personas normalmente expertas en la materia, concretamente mediante la clonación de la expresión de aproximadamente 14.000 genes humanos en el promotor de CMV en células COS. Se transfectaron los combinados de 100 genes en las células COS que crecían en 140 pocillos en placas de 12 pocillos tras la transfección, las células se tiñeron con la proteína LYPD5-Fc (véase la Figura 32). Se identificaron los pocillos con la tinción positiva y se transfectaron los clones individuales en células COS. Se identificó un único pocillo que expresaba una única proteína, GLG-1 (ESL-1) como un ligando de LYPD5. GLG-1 se caracteriza por un dominio extracelular más largo (ECD), un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. Se llevaron a cabo una serie de estudios de inmunoprecipitación simultánea usando técnicas conocidas por las personas normalmente expertas en la materia para evaluar la capacidad de diversas regiones del GLG ECD de unirse a LYPD5. Se encontró que variantes o fragmentos del GLG ECD (véanse las Figuras 33-35) eran capaces de servir como ligando de LYPD5. La Figura 33B muestra los resultados de los estudios de inmunoprecipitación simultánea usando los Fragmentos 1, 2, 3, o 4 tal como se representa gráficamente en la Figura 33A y demuestran que uno cualquiera de los fragmentos es suficiente para la unión de LYPD5.

**[0278]** Adicionalmente, se encontró que un dominio GLG-1 ECD por sí mismo era suficiente para la unión de LYPD5. Tal como se muestra en la Figura 33, GLG-1 se elabora de múltiples dominios GLG-1 y dominios GLG-1 individuales se pueden unir a LYPD5. La Figura 34B muestra los resultados de una inmunoprecipitación simultánea que demuestran que los Fragmentos 1, 2, 3, y 4 así como los dominios GLG-1 individuales 115, 150, 215, 538, 609, 670, 729, y 858 (tal como se muestra en la Figura 34A) fueron capaces de unirse a LYPD5.

**[0279]** A través de otro estudio de inmunoprecipitación simultánea, se muestra que la unión es específica basándose en los fragmentos de LYPD5 (véase la Figura 35A) en los que se encontró que LYPD5 no se unía al control negativo de BAP, y se encontró que el control negativo FN-14 no se unía al fragmento 2 de GLG-1, el dominio 115 de GLG-1 humano se une a LYPD5, el dominio 115 no se expresa siempre a niveles detectables pero todavía hace bajar LYPD5, y la fracción del fragmento 1 de GLG-1 del dominio 115 (restos 26-114) no se une a LYPD5 (Figura 35B).

**[0280]** El "\*" en las Figuras 34A y 35A indica un sitio de fucosilación potencial.

**[0281]** Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por medio de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben construirse como limitantes del alcance de la invención.



**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de detección de la respuesta de un fármaco terapéutico en un mamífero tratado con un agente terapéutico para IBD, en el que el procedimiento comprende determinar y comparar los niveles de expresión de LY6 en una muestra de ensayo que comprende tejidos o células gastrointestinales de dicho mamífero antes y después del tratamiento con dicho agente terapéutico para IBD, en el que un nivel menor de la expresión de LY6 en la muestra de prueba después del tratamiento indica una respuesta del mamífero a dicho agente terapéutico.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo es del colon del mamífero.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo es del íleo terminal del mamífero.
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende:
- 15 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un agente detectable que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido LY6 o uno de sus fragmentos; y (b) detectar la formación de un complejo entre el agente y el polinucleótido de la muestra de ensayo; opcionalmente, en el que el procedimiento es un ensayo de hibridación *in situ* o un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
- 20 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el polinucleótido comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, 6, o uno de sus fragmentos, que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, o 6.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el agente detectable es un segundo polinucleótido que se hibrida a un polinucleótido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 8, 9, 1, 3, 4, 6 o su complemento.
- 25 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el segundo polinucleótido comprende un marcador detectable o está unido a un soporte sólido, en el que el marcador detectable es directamente detectable o indirectamente detectable, y opcionalmente, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
- (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un agente detectable que se une específicamente a un polipéptido LY6 o uno de sus fragmentos; y (b) detectar la formación de un complejo entre el agente y el polipéptido de la muestra de ensayo.
- 35 9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el polipéptido LY6 comprende la SEQ ID NO: 10, 2, 5 o 7 o uno de sus fragmentos, que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 10, 2, 5 o 7.
10. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que el agente detectable es un anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión, opcionalmente en el que el anticuerpo o uno de sus fragmentos de unión comprende un marcador detectable, en el que el marcador detectable es directamente detectable o indirectamente detectable, y opcionalmente en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente o un radiomarcador.
- 40 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el mamífero tiene colitis ulcerosa (UC).
- 45 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el mamífero tiene la enfermedad de Crohn (CD).

50

cgcgtctcggcctgcgttccccgaaagacgaggctgcgcccggattccgggtccgcagggagaccgaagggcacagctccccgcgccg  
cgcacgccgcccagcccggagtgcggacacccccgggatgcttgcgccccagaggaccgcgcccgaagccccgcgccgcccc  
aggcccacccggagcatgctgcctgcagccatgaagggcctcggcctggcgtgctggccgtcctgctgtgctcggcggccgctatgg  
cctgtggtgccaggactgcacacctgaccaccaactccagccattgcaccccaagcagtgccagccgtccgacacgggtgtgtgccagtgt  
ccgaalcaccgalcccagcagcagcaggaaggatcactcgggtaacaagatgtgtccctcctcctgtgacttcgttaagcgacacttttctc  
agactatctgatggggtttattaactctgggatcttaaggtcgactgggactgctgcgagaaggatttgcgaatggggcggcaggggag  
ggcacagccccgggcccctggccggggggcctcctgctcagcctggggcctgccctcctcctgggctgggcccctgatgtcctcctccca  
cggggcttctgagcttgcctcccctgagcctgtggctgccctcctcccagcctggcgtggctggggctgggggagcctggcccagctcc  
gtggctgtggcctgtggctcctactcctccccgacgtgaagcctcccctgtctcctccgagctctgagcccagggcagctggacatcca  
ggaaaccaggccatctgggcaggaggcctggggatgagggtggggggggacccccagggtcccggagggggaagtgaagcaacagcc  
cagctygaagggcgtcctctgcggag aaataaagtcacttttgagtcctgagaaaaaaaaa

Figura 1A

MLPAAMKGLGLALLAVLLCSAPAHGLWCQDCTLTTNSSHCTPKQCQPSDTV CASVRIT  
DPSSSRKDHSVNKMCASSCDFVKRHHFSDYLMGFINS GILKVDVDCCEKDL CNGAAGA  
GHSPWALAGGLLSLGPALLWAGP

**Figura 1B**

agggcgggtgt caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcggcccg ggcaagttag acagttaagg  
 cagtgcccc accacacccc caccagatt ggccacgccg agctggttct tgacagaagg ccttcgaggga ggaagagggg  
 gcacagctgc acaggacacc ctacggagcc tgcgggctg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc cttctctgc  
 agcctcccgg ggcgccaggc tcccggggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggct ggaccacgtc gctggggtac  
 cyaccagtc tgyaagygc agaygacgtg gagtggggag gctgcctcc tatgtcgaa gggccagccg gycacgcagt  
 cctcagaccc tagtccgcac ccggcaggtc cccacggcac ctgctgcgcc ctctcggcg ctccccaac cccccatct  
 cagaaaaacta ccagttctct cccgcccccc ggcgccctt tcccaggaac ytgccggaggc gggagaagag gaagacagga  
 aggggggtgg gatgtgaagc gaccgtccca gcctccccg ccgcccacc ccacccaac tggcagcccg tcacgtgatg  
 cctggagtgg gagggtggga gaaaaggcga gacttttgg ggtgctccc atgccagta gttcctcag tctcagccgc  
 caactccgga ggcgcgggtgc tggcccggg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag ccgggagccc gagcgcgggc  
 gatgcaggct ccgcgagcgg cacctgcggc tctctaacg tacgaccgtc gtcctcggg cagcagcgcg gggcccagca  
 gctcggcag ccacagccgc tgcagccggg gcagcctccg ctgctgctc ctctctgat gcgcttccc tctcccggcc  
 ccgggactcc gggagaatgt gggctctagg catcgcggca acttttgcg gattgtctt gcttccaggc ttgcgctgc  
 aaatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaacaa cgactgctcc tccccagat tcaattgaa ttgcacgggtg  
 aacgttaag acatgtgca gaaagaagtg atggagcaaa gtccgggat catgtaccg aagtctgtg catcatcagc  
 ggctgtctc atgcctctg ccgggtacca gtcctctgc tcccagggga aactgaactc agtttgcatc agctgtgca  
 acaccctct tgltaacggg ccaaggcca agaaaagggg aagttctgcc tggccctca ggcaggggct ccgaccacc  
 atctgttcc tcaaattagc cctctctcg gcacactgt gaagctgaag gagatgccac cccctctgc attgttctc cagccctgc  
 ccccaacccc ccactccct gactgagttt ctctgggtg tcttttat ctgggtaggg agcgggagtc cgtgttctt ttgttctg  
 tgcaataat gaaagagctc gtaaaagcat tctgaataaa ttcagcctga ctgaatttc agtatgtact tgaaggaagg  
 aggtggagt aaagtacc cccatgtctg tgaaccgga gtaagcca ggctggcaga gtcagctctt agaagtact  
 gagggtggca tctgcttct gtaaacctc cagtgtccat tccatccct atgggggat agtttgagac tgcagagtga  
 gactgactt tcttaggc tggaggcca gttccactc aagctccct ccttgacat tcaacttca tctctgaa aaccattctc  
 tgcagcagaa ttggctggt tgcgctga gttggctct agtgactga gactcaatga ctgggacta gactgggct  
 cggctcgt ctgaaaagt ctaagaaaa tctctcagt tctctgca gaggactggc gccgggagc gaagagcaac  
 gggcgtgca caaagcggg gctgtgggtg gtggagtgc catgtacgc caggcctc tctgggtgg cgtgtgtag  
 cgacagcgg cagcagcga cctgcacgaa caccgccga aactgtgctc aggacaccgt gtacaggagc gggttgatga  
 ccgagctgag gtgaaaaaac gctccgaga aggggaggag gatcatgtac gccgggaagt aggacctct ctagctgctc  
 ttgggttgg ccgagccat gatcctccga atctgggtg gcatccagca tacggccaat gtcacaaca tcagccctgg  
 gcagacacga gcaggagga gagacagaga aaagaaaa acagcatgag aacacagtaa atgaataaaa ctaaaaaa  
 tttagccct ctgtctgtg ctactggcc aggaaatgt accaatttt cagtgttga ctgacagct tctttgcca caagcaagag  
 agaattaac actgttcaa accggggga gttggctgtg taaagaaag accatlaat gcttagaca gtgtattat accagttgat  
 gctgttaat ttaaaaaa tttttcatt ggtgtttgt tgcgtatcca gaaagcagtt calgtatcc ata

Figura 2A

gatgcctgga gfgggagggtg gggagaaaa gcgagacttt tgggggtgct cccgatcgcc agtagttcct tcagtcicag  
ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcggcc cgggagcgcg agcgggagga gcagagacc gcagccggga gcccgagcgc  
gggcgatgca ggctccgca gcggcacctg cggctcctc aagctacgac cgtcgtcctc gcggcagcag cgcgggcccc  
agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgctcctc tgatgcgctt gccctctccc  
ggccccggga ciccgggaga atgtgggicc taggcatcgc ggcaacttt tgcggattgt tcttgctcc aggctttgcg  
ctgcaaatcc agtgctacca gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctcccc gagttcattg tgaattgcac  
ggtgaacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgatggag caaagtgccg ggatcatgta ccgcaagtcc tgtgcatcat  
cagcggcctg tctatcgcc tctgcccgggt accagtcctt ctctccca gggaaactga actcagttg calcagctgc  
tgcaacacc cttttgtaa cgggccaagg cccaagaaaa ggggaagttc tgctcggcc ctcaggccag ggtccgcac  
caccatctg tctcaaat tagcctctt ctggcacac tctgaagct gaaggagatg ccacccctc ctgattgtt ctccagccc  
tcgccccaa cccccacct cctgagtgta gtttctctg ggtctctt tattctgggt agggagcggg agtccgtgtt cttttgtt  
cctglcaaa laalgaaga gctcggtaaa gcattctgaa taaatcagc ctgactgaat tticagtatg tacttgaagg  
aaggagggtg agtgaagtt cccccatg tctgttaac cggagtcaag gccaggctgg cagagtcagt ccttagaagt  
cactgagggtg ggcactcgc tttgtaaag cctccagtgt ccattccalc cctgatgggg gcatagttg agactgcaga  
gtgagagtga cgtttctta gggctggagg gccagttcc actcaaggct cctcgcctg acattcaaac ttcattctc  
tgaaaaccat tctcgcagc agaattggtt ggttccgcg ctgagttgg ctctagtac tcgagactca atgactggga  
cttagactgg ggctcggcct cgtctgaaa agtgccttaag aaaatctct cagtctctt tgcagaggac tggcggcggg  
acgcgaagag caacgggcg tgcacaaagc gggcgctgtc ggtgggtggag tgcgcatgta cgcgcaggcg cttctctgg  
ttggcgtct gcagcgacag gcggcagcac agcacctgca cgaacaccg ccgaaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag  
gagcgggttg atgaccgagc tgaggtagaa aaacgtctc gagaagggga ggaggatcat gtaccccg aagtaggacc  
tctccagtc gtcttgggt ttggccgag ccatgatct cgaatctgg ttggcatcc agcatacggc caatgtcaca  
acaatcagcc ctggcgac acgagcagga gggagagaca gagaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat  
aaaaccataa aatatttagc cctctgttc tgtcttact gccaggaaa tggtaaccaat tticagtgt tggactgac agctcttt  
gccacaagca agagagaatt taactgtt tcaaacccgg gggagttggc tgtgttaaag aaagaccatt aatgctta gacagt

Figura 2B

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCCSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV  
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSGKLNVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA  
SALRPGLRRTTILFLKLALFSAHC

**Figura 2C**

aaggctgggg ttgctgggg cgaggttact calcctgggc lcaggtaaga gggcccgagc tcggaggcgg cacatccagg  
ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc aggaaagcag gtgccaggc catgatctgg actgcaggct  
ygctgctgci gctgctgctt cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtac agctgctgc agaaagcaga tgacggatgc  
lccccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc gtgggggcgg tggagacat  
ccacggacaa ttctcgtgg cagtgcgggg ttgcggttcg ggactccccg gcaagaatga ccgcggcctg gatcttcag  
ggcttctggc gttcatccag ctgcagcaat gcgctcagga tcgctgcaac gccaagctca acctcacctc gcgggctc  
gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgtca cagctgtgtg ggcctgagcc gggaggcgtg  
ccagggtaca tcgccgcccgg tcgtgagctg ctacaacgcc agcgatcatg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca  
ccttgacggc agctaatgtg actgtgtcct tgcctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgactcg ggalggagta  
acaggcccag ggttcacgct cagtggcicc tgitgccagg ggtcccgtg laactctgac ctccgcaaca agacctact  
ctcccctcga atcccacccc ttgtccggct gccccctcca gagcccacga ctgtggcctc aaccacatct gtcaccact  
ctacctggc cccagtgaga cccacatcca ccacaaacc catgccagcg ccaaccagtc agactccgag acaggggagta  
gaacacgagg cctcccggga tgaggagccc aggttgactg gaggcgccgc tggccaccag gaccgcagca atcagggca  
glatcctgca aaaggggggc cccagcagcc ccataataa ggctgtgtgg ctcccacagc tggattggca gcccttctg  
tggccgtggc tgcctgtgtc ctactgtgag ctctccacc tggaaatc cctctcact acttctctgg ccttgggtac cctctctc  
atcacttctt gttcccacca ctggactggg ctggcccagc cctgtttt ccaacattcc ccagtatccc cagcttctgc tgcctggit  
tgcggcttgg ggaataaaaa taccgttga tatattctgc caggggtgtt ctagctttt gaggacagct cctgtatctt tctatcct  
gtctctccgc ttgtctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag ctgtcacggg gaaggtgaga gagaggatgc  
taagcttctt actcacitc tctagccag cctggacttt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctcc ccacttaag  
cactgctcc cctactcccc gcatcttgg ggaatcggtt cccatattgt ctctctact agactgtgag ctctcgagg  
gcagggaccg tgcctatgt ctgtgtgtga lcagttctg gcacataaat gccicaataa agatttaatt actttgaaaa aaaaaaaaa  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

Figura 3A

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAP  
GVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCN  
AKLNLTSRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGC  
FDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYF  
SPRIPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTSAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGEHEASRDEE  
PRLTGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLAVAAGVLL

Figura 3B



gatccgcttt ggcacatccca gtgattcttg ggttccgctg gtglttcgg aaggagacat cgaagcaggg cgaggcgag  
agggcgltgc ygactcatgc cccagtcggc agtgcggggg cccaagccct gcagtgctac agctttgagc acacctactt  
tggcccttt gacctcaggg ccatgaagct gccacgac tcctgtctc atgagtgctt tgaggctatc ctgtcttgg  
acaccgggta tcgctcgccg gtgaccctgg tgcggaaggg ctgctggacc gggcctctg cgggcccagac gcaatcgaac  
gcggacgctc tgcgcccaga ctactcggtg gtgcgctgct gcacaactga caaatgcaac gccacccca tgactcatga  
cgcctcccc aacctgagcc aagcaccga cccgcccagc ctacagggcg ccgagtgcta cgcctgtatc ggggtccacc  
aggatgactg cgtatcggc aggtcccagc gactccagtg taccaggac cagaccgctt gcttccaggg caatggcaga  
atgacagttg gcaattctc agtccctgtg tacatcagaa cctgccaccg gccctcctgc accaccgagg gcaccaccag  
cccctggaca gccatcgacc tccagggtc ctgctgtgag gggctacctt gcaacaggaa atccatgacc cagccctca  
ccagtcttc agccaccacc cctcccag cactacaggt cctggccctg ctctcccag tctctctgt ggtggggctc  
tcagcataga ccgcccctc aggatgctgg ggacagggt cacacacctt attctgtg ctccagccc tatcatag  
ctactggaa aatgatgta aagtaagaat tgcactctg tcccttggc ctccatctc tccgcccctt gtccccaca acctggccaa  
cagtactgga agaaactgga cacagtcacc agcatcccc gggagggcaa aacagccatg tctgtcccag atgaagagca  
attctgatca cagctgttac tcactgagca ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttctgtg ctctcccctc  
agagccctg gcagctctag gaggagctc tacaatgat tctttatag tctcatcatg agaagcccaa taagcagat  
gccctaacg ttgtaggccc aggtcttggg gctaaagctc atgggttcaa atcccagctc caccattcag cctgcagaga  
ccatgagcga gttacttaag ccaggctctg gagtaagct gcatgggttc aaatcccagc tccagcattc agcctacaga  
gaccatgggt gagttacta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaatccca gctccaccat tcagcctgca  
gagactgttg gtgagttact tgagctctt gtccaatat ttctcacct ataaggtgga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga  
actactcac agtagttgca gtgaggaltc aacgagatga acatttagta ctggggacac agcagtgccc cagttaaat  
gggtacttg tcalaagccc taagtcacag gtaacaaaac tgagaggcaa aagcacttgg ttgagcttgt gtatctagt  
agtatgatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg ctaagcaacc ccacctcta aacacatgag tgcgattaa  
cttcacagaa aaacacacaa ggcaaagttc agcagggtga aatttccaa gctataaaga tcaggaaga ctctctggag  
gaattcacc ttgagcaaaa tctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag gaagcgcatt ctaggtagag  
gagacagctt ggacaaaagt ctgaggagg aaggagcaca aggagtgag gacacttca tgagtgagg acacttcat  
aactgatga acttcataga gatgggatcc tttagcatgt tctctgtgca catgctgac catgttctt cacatgctt ttgccctg  
atcttccag caactcagtg agagaagcaa aaaagtaagt tgcactctg tattgtctga atgtttgtt ctccccaaa tcatcttt  
gaaacctaat taccaaaagtg atattactgg gaggtggggc ctgtggagg tggtagatc atgagggtg agccccatg  
aataggatta gtcccctat aaaagaggcc ctggagagct gccctgccc tccaccaca tgagaacaca gccagcaggt  
gcctataagc aagaaaagtg gttctacca gccatcgaat ctgctggtg attgattgca gacttcccag actccagagc  
tatgagacat aaattctgt tgtgtataag ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Figura 4A

gatlctggg ttccgcgct agttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag ggcgtgctgg actcatgccc  
 cagtcggcag tgcggggctc caagccctgc agtgcctacag CttgagCaC acctactttg gccctttga cctcagggcc  
 atgaagctgc ccagcatctc ctgicctcat gaggctttg aggcctatcct giccttgagc accgggtatc gcgcgccggt  
 gaccttggg cggaagggct gctggaccgg gccctctgcg ggccagacgc aatcgaacct ggacgcgctg ccgcccagact  
 actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatcgaacgc ccacctcat actcatgacg cctccccaa cctgagccaa  
 gcaccgacc cgcgcgctc cagcggcgc gagtgctacg cctgtatcgg ggtccaccag gatgactgcg ctatggcag  
 gtcccagca gtcagtgct accaggacca gaccgctgc ttccagggca gtggcagaat gacagtggc aatttcicag  
 tccctgtga catcagaacc tgcaccggc cctcctgac caccgagggc accaccagcc cctggacagc catgacctc  
 cagggctcct gctgtgagg gtacctgac aacaggaaat ccatgacca gccctcacc agtgcctcag ccaccacccc  
 tcccagagca ctacaggtcc tggccctgct cctcccagtc cctctgctgg tgggctctc agcatagacc gccctccag  
 gatgctggg acagggctca cacacctcat tctgctgct tcagccccta tcacatagct cactggaaaa tcatgtaaa  
 gtaagaattg cactcctgct cctctggcct tccatctc ctgcccctgt gcccacaac ctggccaaca gtactggaag  
 aaactggaca cagtcaccag catcccagg gagggcaaaa cagccatgct gtgccctgat gaagagcaat tctgatcaca  
 gctgttactc actgagcacc agccaggcac caggcaccac ataacacggt ttctgtgct ctcttccag agcctgtcgc  
 agcttaggg gggagctata caatgatgct ttatagtg tcatcatgag aagcccaata agcagtatgc cctaacagtt  
 agtagggcag gctctggagc taagctgcat gggttcacat cccagctcca ccattcagcc tgcagagacc atgagcgagt  
 tactaagcc aggccttga gctaagctgc atgggttcaa atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga  
 gttacttaag ccaggctctg gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt  
 gaggacttg agctctctgt gccaatattt tctacctat aaggtggagg tgaataaaa ctctataaca tgacaagaac tacttcacag  
 tagttcagt gaggattcaa cgagatgaac atttagtact tgggacacag cagtggcca gtataaatgg gctactgtc  
 ataagccca agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttgggt gagcttgtgt atctagttag tatggatica  
 gggaccagat tcccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctcctaaa cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa  
 acacacaagg caaagttcag cgagggtgaaa ttctcaagc tataaagatc aggggaagact tctggagga attaccctt  
 gagcaaaatc ctaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacattt aggtagagga gacagcctg  
 acaaaggtct gaggagggaa ggaacacaag gagtgcagga cacttcata actgcatgaa ctctatagag atgggatct  
 ttacatgtt ctctgtgac atgctgacc atgttcttc acatgcttt tcccactga tcttccagc aactcagta gagaagcaaa  
 aaagtaagtt gcaicctg

Figura 4B

MKLPSISCPHECFEAILS LDTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTQSNADALPPDYSVVRG  
CTTDKCN A HLMTHDALPNLSQAPDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQ  
TACFQGN GRMTVGNFSVPVYIRTCHRPSCTTEGTTSPWTAIDLQGSCCEGYLCNRKSMT  
QPFTSASATTPRALQVLALLLPVLLLVGLSA

Figura 4C

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactataa agtcctgttt gctgattctt cttgtggccc  
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgttacca gtgctatgga gtccatttg agactcttg cccatcaatt  
acctgccccl accctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa  
caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaactg aagacttct gtggccagga  
agacctctgc aatglagcag ttccaatgg aggcagcacc tggaccatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag  
tcctctgca gaccttgc tcatgttctt cccaatgacc iccacccttg tcltttatc ctcattgca acaattctc ctggagccct  
ctagtatga attatgatt atagaagctc caaggtggga gtagtgtgtg aaataccatg tttgcctt atagcccctg ctgggtaggt  
aggtgctca atcctccta gggcttcaa gtcgtactt cctagaatgt cattttgtg tggattgctg ctcattgccc tggaggcaca  
cagccagcac agtgaagagg cagaattca aggtattatg ctatccat ccacacataa gtatctgggg tctgcaatg  
ttccacatg tatctgaat gtcccctgt tgagtccaat aaacccttg ttccccttca aaaaaaaaa aa

Figura 5A

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV  
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG  
VLLFSLSSVLLQTLL

**Figura 5B**

gclccggcca gccgcgggcc agagcgcgcg aggttcgggg agclccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag  
 caggacaggc lgcittggti tglgacctc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgcctc  
 tggctgccct tclgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa lctgtactgc  
 ctgaagccga ccalctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc ggcatlggga atctcgtgac  
 atttggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatccag aaggcgtaaa tgttgggtgtg gcttccatgg  
 gcatcagctg ctgccagagc ttctgtgca attcagtgcc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt  
 gccgggctgc tgcctgacct gctgccggcc ctgctgcggt ttggcccctg accgccaga ccctgtcccc cgalccccca  
 gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atcccacagt gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgcct galctgtgcc  
 ctlygtccca ggtcaggccc acccctgca cctccacct cccagcccc tgcctctgcc caagtggggc agctgccctc  
 acttctgggg tggatgatgt gaccttctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct ggagtcttac ggtccaacat  
 cagaccaagt cccatggaca tgcctgacagg gtccccaggg agaccgtgc agtagggatg tctgcctggc tglgtactg  
 ggtgtgagc gcacgtgaga gcacgtggcg gcttctgggg gccatgttg gggagggagg tctgccagca gccctggagag  
 cctcagctcc tglagcccc tgcctggca cagctgcatg cactcaagg gcagcctttg ggggttgggg ttctgccac  
 ttccgggtct aggccctgcc caaatccagc cagtctgcc ccagcccacc cccacattgg agccctcctg ctgcttgggt  
 gccicaata aatacagatg tccc

Figura 6A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL  
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNNGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL  
SLLPALLRFGP

**Figura 6B**

ccagtcgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga gcacagagga gtgggcccggg  
accatgcggg ggacgcggct ggcgtcctg gcgctgggtc tggctgcctg cggagagctg gcgcccggcc tgcgtgcta  
cgtctgtccg gagcccacag gagtgcggga ctgtgtacc atgcaccct gcaccaccaa cgaaacctg tgcaagacca  
cactctact ccgggagata gtgtaccct tccaggggga ctccacgggtg accaagtct gtgccagcaa gtgtaagccc  
tcggatgtgg atggcatcgg ccagaccctg cccgtgtct gctgcaatac tgagctgtc aatgtagacg gggcgcccgc  
lctgaacagc ctccactgg gggccctcac gtcctccca ctctgagcc tccgactgta gagtcccgc ccacccccat  
ggccctatgc ggcccagccc cgaatgcctt gaagaagtgc cccctgcacc aggaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Figura 7A



MRGTRLALLALVLAACGELAPALRCYVCPEPTGVSDCVTIATCTTNETMCKTTLYSREI  
VYPFQGDSTVTKSCASKCKPSDVDGIGQTLPVSCCNTELCNVDGAPALNSLHCGALTLL  
PLLSLRL

**Figura 7B**

aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgttccgt tgcggcggc gctgcatctg ctgctgctat tcgcgccgg  
ggccgagaaa ctccccggcc atggcgcca cagccagggc cagggtcccg gggccaactt tgttcttc gtagggcagg  
ccygagggcg cggccccggc ggtcagcagc tccccagct gctcagica tgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag  
caacagcaac agcagcttca gcccccgag ccgctttcc cggcgggagg gcctccggcc cggcggggag gagcggggc  
tggggggc tggaaagtgg cggaggaaga gtctgcagg gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca  
acaacctggc ggtgctgag tgcctgaggg atgtgagga gcctgaaaat gaaatttct cagactgcaa tcattgttg  
tggaaata agtgaacct aactacagat cccaaattg aatctgtgc cagagaggtt tgc aaatcta ctataacaga  
gattaaaga tgtctgatg aaccggttg aaaaggttac atggttctt gcttagtga tcaccgagc aacatcactg  
agtatcagtg tcaccagatc attaccaaga tgcggccat cattttagt gattaccgtt taatctgtg ctcatggat gactgcaaaa  
atgacatcaa catttgaat tgtggcagta ttcggcttg agaaaaggat gcacattcac aagtgagggt ggtatcatg  
ttgggaaag gcctgtgaa agaagcagaa gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctgcaaga aagccattct  
ccgggtgct gagctgcat cggatgactt tcattagac cggcattat atttgcctg ccgagatgat cgggagcgtt ttgtgaaa  
tacacaagct ggtgagggca gagtgtataa gtgcctttt aaccataaat ttgaagaatc catgagtga aagtctcag  
aagcattac aaccggcaa aagctgattg ccaggatta taaagtcagt taticattgg ccaaatcctg taaaagtac  
ttgaagaaat accggtgcaa tgtgaaaac ctcccgat cgcgtgaagc caggctctc tactigttaa tgtcctgga  
gtcagctga tcaagagggc gacaagtcag cagtgagtc cagggggaga tcttgatta ccgacgcatg ttgtggaag  
actttctct gagccctgag atcatcctaa gctctgggg ggagattgaa caccattgtt ccggattaca tcgaaaagg  
cggaccctac actgtctgat gaaagtgtt cgaggggaga aggggaacct tggaaatgaa tgcacgagc cgcitcaaac  
actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgalt gatcgagct tgaatgaagc ttgtaatct gtaatccaga  
cagctgcaa acataaaga tctggagacc caatgactt gctgtgcctg atggaacatt tatacacaga gaagatggt  
gaagactgt aacaccgtct cttagagctg cagtattca tctccggga ttggaagctg gaccctgct tgtaccgaa  
gtgccaggga gacgtctc gtcttgcca caccacggt tggaaatgaa ccagtgaat tatgctcag ggagctgtt tcttgttt  
atacagacac gcctaccgca ctgaggaaca gggaaaggagg ctctcaggg agtgccgagc tgaagtcaa aggatctac  
accagctgc catggatgc aagctggatc ctgctcca ggataagtgc ctgattgac tgggaaatg gtcagtgag  
aaaacagaga ctggacagga gctggagtc ctccagacc atctggatga ctggtgtg gagtgtagag atatagttg  
caacctact gattagaat cagaggatat tcaaatagaa gcctgtctga tgagagctg tgagccata attcagaact  
ctgcccaga tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag tcttgatac agaacaaca ccagaaggac  
atgacgaga agtgtgcat cggagtacc cactccagc tggtcagat gaaggattt cggtttctt acaagttaa aatggcctg  
aagagggagc tgtgaaagt ttgcccaac ataaaaaga aggtggagct ggtgatctc ctgagcacga ccgtgcgcaa  
tgacactctg caggaagcca aggagcacag ggtgtccctg aagtgccga ggcagctccg tgtggaggag ctggagatga  
cggaggacat cgcctggag

Figura 8A

ccagatctat acgaagcctg caagagtgac atcaaaaact tctgttccgc lgtgcaatat ggcaacgctc agattatcga  
 atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag cccccgtgc caccaaaaag tattaagct gcaggagaca gagatgatgg  
 acccagagct agactacacc ccatgagggg tctgcaagca gatgataaag aggttctgtc cggaaagcaga ttctaaaacc  
 atgttgagct gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatcccaa atgcaaacag atgataacca agcggcagat  
 caccagaac acagattacc gcttaaaccc catgtaaga aaagcctgta aagctgacat tcctaaattc tgtcacggta  
 tctgactaa ggccaaggat gattcagaat tagaaggaca agtcatctct tgcctgaagc tgagatatgc tgaccagcgc  
 ctgtctcag actgtgaaga ccagatccga atcattatcc aggagtccgc cctggactac cgcctggatc ctgagctcca  
 gctgactgc tcagacgaga tctccagict atgtgctgaa gaagcagcag cccaagagca gacaggcag gtggaggagt  
 gcctcaaggt caacctgctc aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa gtgctaaaca tgcgaagga aagcaagca  
 gacatcttg ttgaccgggt actcatact gcttgtgcc tggacalaa acaccactgc gcagcatca ccctggccg  
 cgggcgtcaa atgtctgtc tcatggaagc actggaggat aagcgggtga ggttacagcc cgagtcaaa aagcgcctca  
 atgaccggat tgagatgtgg agttacgcag caaagtggtg cccagcagat ggcttctctg atctgcat gcaagtaatg  
 acgttccat ctaagaacta cattctctct gtgatcagtg ggagcatctg tatattgtc ctgattggcc tgatgtgtgg acggatcacc  
 aagcagtgta cacgagagct caaggacagg tagagccacc ttgaccacca aaggaactac ctatccagtg cccagttgt  
 acagcctct tglatagcat cccactcac ctgctcttc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc attagcagat  
 gtccactgg ttgtccatc cagcctccac tegtgtccat ggtgtctcc tctcctcac cgtgcagcag cagcagctgg  
 tctgtgggt tactgcttt gttggcaaa ctggggtta cctgcctgta gacaagctc tctcatacca acagaacttc cggctactcc  
 agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggcttttta agaaaaccac caaaaaaaaa a

Figura 8A (continuación)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLLFAAGAEKLPGHGVHSQGGPGANFVSFVGQAGGGG  
PAGQQLPQLLQSSQLQQQQQQQQQQQLQPPQPPFAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE  
EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENEISSDCNHLLWNYKLNLTDPKFE  
SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI  
CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSACLEKGLVKEAEEREPKIQVSELCKK  
AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCR  
EALTTRQKLIAQDYKVSYSLAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESVHR  
GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPHILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR  
GEKGNLGMNCQQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL  
MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCQGDASRLCHTHGWNSETSEF  
MPQGAVFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLG  
KWCSEKTETGQELECLQDHLDDLVECRDIVGNLLESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC  
HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE  
DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP  
DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT  
LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP  
MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKRLRYADQRLSSDCEDQIRIIIQESAL  
DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLKIKTELCKKEVLNMLKE  
SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND  
RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE  
LKDR

Figura 8B

gcgtcgagct cgcgcggac tcaagatggc ggcgtgtgga cgtgtacgga ggatgtlccg cttgtcggcg gcgctgcac  
 tgcgtctgct attcgcggcc gggcccgaga aactccccgg ccagggcgtc cacagccagg gccaggggtcc cggggccaac  
 ttgtgtcc tctagggca gggccggaggc ggcggcccgg cgggtcagca gctgccccag ctgcctcagc catcgagct  
 lcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagcccgccg agccgcctt cccggcgggt gggcctccgg  
 cccggcggg aggagcgggg gctgggggg gctggaagct ggcggaggaa gatlctgca gggaggacgt gaccgcgtg  
 tgcctaagc acacctggag caacaacctg gcgggtgctg agtgcctgca ggatgtgagg gacctgaaa atgaaattc  
 ttcagactgc aatcattgt tgtggaatta taagctgaac ctaactacag atcccaaatt tgaatctgt gccagagagg ttgcaaatc  
 tactataaca gagattaag aatgtgctga tgaaccggtt gaaaaagggt acatggttc ctgcttggtg gatcaccgag  
 gcaacaicac tgagtacag tgcaccagt acattacaa gatgacggcc atcattttta gtgatlaccg ttaactctgt ggcttcattg  
 atgactgcaa aatgacalc aacattcga aatgtggcag tattcggctt ggagaaaagg atgcacattc acaaggtgag  
 gtggtatcat gcttgagaa aggcctggtg aaagaagcag aagaagaga acccaagatt caagtctg aactctgcaa  
 gaaagccatt ctccgggtgg ctgagctgic atcggatgac ttacattag accggcatt atatttct tccgagatg  
 atcgggagcg ttttgtgaa aatacacaag ctggtgaggg cagagtgtat aagtgcctc ttaaccataa attgaaaga  
 tccatgagtg aaaagtgtc agaagcactt acaaccgcc aaaagctgat tcccaggat tataaagtca gttattcatt  
 ggccaalcc tgaagtg acttgaaga ataccggtg aatgtgaaa acctcccg atcgcgtgaa gccaggctc  
 cctactgt aatgtcctg gactcagctg tacacagagg gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgctgat  
 taccgacgca tgtgatgga agactttct ctgagccctg agatcctc aagctgctgg ggggagattg aacaccattg  
 ttccgatta catgaaaag ggcggaccct acactgtctg atgaaagtag ttcgagggga gaaggggaac ctggaatga  
 actgccagca ggccttcaa acactgattc aggagactga cctggtgca gattaccgca ttgatgagc ttgaaatgaa  
 gcttgaat ctgtaacca gacagcctgc aaacataa gatctggaga cccaatgac ttgtctgcc tgatggaaca ttatacaca  
 gagaagatgg tagaagactg tgaaccctg ctcttagagc tgcagtatt catctcccg gatgggaagc tggaccctgt  
 cctgtaccgc aagtgccagg gagacgttc tctcttgc cacaccacg gtggaaatga gaccagtga tttatgcctc  
 agggagctgt gttctctgt ttatacagac acgcctaccg cactgaggaa caggaagga ggctcagc ggagtccga  
 gctgaagtc aaaggatct acaccagct gccatggatg tcaagctgga tctgccctc caggataagt gctgattga  
 tctgggaaaa tgggtcagtg agaaaacaga gactggacag gagctggagt gcctcagga ccatctggat gacttgggtg  
 tggagttag agatagatt ggcaacctca ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagcctgct gatgagagcc  
 tgtgagccca taattcagaa ctctgccac gatgtggcag ataaccagat agactctggg gacctgatg agtgtctgat  
 acagaacaaa caccagaag acatgaacga gaagtgtgcc atcggagtt cccactcca gctggtgag atgaaggatt  
 ttcggttc

Figura 8C

ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgtgaag cttgcccac acataaaaaa gaaggtggac gtggfgatct  
 gccigagcac gaccgtgccc aatgacactc tgcaggaagc caaggagcac aggggtgtccc tgaagtccc caggcagctc  
 cgtgtggagg agctggagat gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgcaagagtg acatcaaaaa  
 cttctgtcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaaaa gaagcagcta agcaccgct  
 gccacaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat ggaccagag ctgactaca ccctcatgag ggtctgcaag  
 cagatgataa agaggttctg tccggaagca gattctaaaa ccatgttca gtgcttgaag caaaataaaa acagtgaatt  
 gatggalccc aaatgcaaac agatgataac caagcggcag atcaccaga acacagatta ccgcttaaac cccatgttaa  
 gaaaagcctg laaagctgac attcctaaat tctgtcacgg latctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga  
 caagtcactt cttgcctgaa gctgagatal gctgaccagc gcctgtctc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat  
 ccaggagtcc gccttgact accgcctgga tctcagctc cagctgact gctcagacga gatctccagt ctatgtgctg  
 aagaagcagc agcccaagag cagacaggtc aggtggagga gtgctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg  
 tglaaaagg aagtgtctaa catgctgaag gaaagcaag cagacatctt tgtgaccg gtactcata ctgctgtgc  
 ctggacatt aaacaccact gcgcagccat caccctggc cgcggcgtc aaatgtctg tctcatgaa gcaactggagg  
 ataagcgggt gaggttacag cccgagtga aaaagcgcct caatgaccg attgagatgt ggagttacgc agcaaagggtg  
 gcccagcag atggcttctc tgatcttcc atgcaagtaa tgactctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag tgggagcctc  
 tglatattgt tctgtattgg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata  
 caggtcagag acaatggctt ataaaggitt agtgtgtcti caggatgtga caggcagctc agcctgacct ttctgcacac  
 tccagacaaa ctcccgac aagctcttt gtgcctctac gtggagaggg tgtgaaagt taccacata aaagatggag  
 gatllaaaa aaaaaaaa aaaaaaaaa aaagaaaaa aaaaaaaaa

Figura 8C (continuación)

MAACGRVRRMFRLSAALHLLLLFAAGAEKLPGQGVHSQGQGPANFVSFVGQAGGGG  
 PAGQQLPQLPQSSQLQQQQQQQQQQPQPQPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE  
 EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENESSDCNHLWNYKLNLTDPKFE  
 SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIIIFSDYRLI  
 CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCLEKGLVKEAEEREPKIQVSELCKK  
 AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCR  
 EALTTRQKLI AQDYKVSYS LAKSCKSDLK KYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESAVHR  
 GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSL SPEIILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR  
 GEKGNLGMNCQQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL  
 MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISR DWKLDPVLYRKCCGDASRLCHTHGWNETSEF  
 MPQGA VFSCLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLG  
 KWCSEKTETGQELECLQDHLDDL VVECRDIVGNL TELESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC  
 HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE  
 DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP  
 DLYEACKSDIKNFCSAVQYGN AQII ECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT  
 LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNS ELMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP  
 MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLK LRYADQRLSSDCEDQIRIIIQESAL  
 DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCKKEVLNMLKE  
 SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND  
 RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE  
 LKDR LQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSPA

Figura 8D

caaaaacttc tglccgctg tgcaatatgg caacgcicag attatcgaat gctgaaaga aaacaagaag cagctaagca  
 cccgctgcc ccaaaaagta ttaagctgc aggagacaga gatgatggac ccagagctag actacaccct catgagggtc  
 tgaagcaga tgataaagag gttctgtccg gaagcagatt ctaaaacct gttgcagtc tgaagcaa aaaaaacag  
 tgaattgat gatcccaat gcaaacagat gataaccaag cgcagatca cccagaacac agattaccgc ttaaacccca  
 tgltaagaaa agcctglaaa gctgacatt ctaaattctg tcacggatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta  
 gaaggacaag tcalctctg cctgaagctg agatatgctg accagcgct gcttcagac tglgaagacc agatccgaat  
 cattatccag gagtccgcc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc agacgagatc tccagtctat  
 gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcaggt ggaggagtgc ctcaaggta acctgtcaa gatcaaaaca  
 gaattgtga aaaaggaagt gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaagcaga catctttgtt gaccggctac ttcatactgc  
 ttgtccctg gacallaac accactgcgc agccatcacc cctggcgcg ggcgtcaat gtcctgtctc atggaagcag  
 tggagataa gcgggtgagg ttacagcccg agtgcaaaa gcgctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgagca  
 aaggtggccc cagcagatgg ctctctgat ctgccatgc aagtaatgac gctccatct aagaactaca tctctctgt gatcagtggg  
 agcalctgta tattgttctt gattggcctg atgtgtggac ggalcaccaa gcgagtgaca cgagagctca aggacaggta  
 gagccacctt gaccacaaa ggaactacct atccagtcc cagttgtac agcctcttg tatagcatcc ccactcact  
 cgtctctc agaagtgaca ccaacccgt gtagagcat tagcagatgt ccactgcgtt gtccatcca gctccactc  
 gtgccatgg tgcctctc ctctcaccg tgcagcagca gcagctggic gctggggta ctgctttgt ttggcagact tggttacct  
 gcctgtagc aagtctct cacaaca gaactccgg tactccaga accaactcac ctgacctgca acicaaaggc tttttaaga  
 aaaccacaa aaaaaaaaa tttttaag aaaaaatgt atatagtaac gcalctctc caggcttgal ttggcaatg gggttatgc  
 tttcatatga ctgtlaaaa caaagacagg acttggaggg gaagcacacc acccagtgtg ccatgactga ggtgtctgt  
 tcalctca gaagcctt ggggcctcgc caggccctg gcttcaccg aggcgtgggt gggcagccgt tcccaggct  
 gtgtgggtc ctgcttct ctgctgagac agtgacgtt tccagttcc acctaatca gccactgctg gtcacagccc  
 cacagccatg ggtattctg tggctctc gctcattga agcaaagcat gaccttct agacaagggc agctggggag  
 gggaaggac cggaagttt tgaagttgaa cagtcctcc atctgactg agaggctgga tctgagtc cggggcagca  
 ggalccagg aacctctc ctccaggca gcacaggact cagccgtgc tggaccggcc ctgctgaggc tacagtact  
 ctggaagctc tgccttcat caggaggcag gactgtggc ggaggggtcc tgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca  
 gaaagtgga gccagaggt tgaactact tctttatt ttccagctac aatacaggtc agagacaatg gcitaaaaag gtttagtgtg  
 gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg acctctctc acactccaga caaactccc agacaagctc ctgtgtcct  
 ctacgtggag aggggtgga aagttatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa

Figura 8E



MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSELMDPKCKQMITKRQIT  
QNTDYRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCED  
QIRIIQESALDYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCK  
KEVLNMLKESKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALDKRVRLQ  
PECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMC  
GRITKRVTRELKDR

Figura 8F

aalltagcca gctgtggigg cacatactg taatcccagc tacttgagag actgagycag gagaatcact tgaaccggga  
gatggagtlI gcagtgagcc gagatgggtc cactgtactc cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaa  
aaaaaaaaa aaaaaaaga catticaagc tggaaagatt ggcticctaa ctttgagcct agctcttca itaaagtaat aataaaagta  
gaactctaca ttatataat gglltgact ttcaaagtg attticacat ctacagtc ctgtgaagga ctaataagg tgttcaggg  
tagacttgc attgttttI gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtagaca attgaaagta aagcctgatt ctctgtctgc  
aaggcgactI tctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtca acaataagt ctccagaaca tatgatctI  
ccagcctaaa ccaagctcac ctttccatgc tggctccctc atgcagacgg aggacatccg ctgggagcca gatctatacg  
aagcctgcaa gagtgacatc aaaaacttct gtccgcigt gcaatatgac aacgctcaga ttatcgaatg tctgaaagaa  
aacaagaagc agctaaagc cgcgtgccac caaaaagat ttaagctgca ggagacagag atgatggacc cagagctaga  
ctacaccctc atgagggtct gcaagcagat gataaagagg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgcagtgtI  
tgaagcaaaa taaaacagI gaattgatgg atcccaaat caaacagatg ataaccaagc gccagatcac ccagaacaca  
ggtaaagatI tggctggct ctctggccc cgtggagtat ctgaaaagga atcagtgcc tgtagagtga cctgtcctaaa  
ctcccagggc ttgttgctI gggaatttIa agggaggagt ctgagtgtaa gcaggccctI ctctcttga ggagcatcca  
gaaaaatgga gggagagtca ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaagctc agaaggaatc  
aggccggcag tcttggaaa gaaaaatcta gaaatcaat aaaacttcaI gagtgtgcca ggagaatgta cgggtaatct  
galtcyyaac agaaacattI cactctgag ttggaagacc tctgaagta atggcacag tgagttggat attgtattc ttttcagtI  
tttcaaaaag tgtctgtatI ggggaagggtI gctgtgtcc ccttgattI tctgaggactI ctttagagta ttggagtctI cacaaaacc  
cgagagtag aaagattctI gaggacctc agaagtactc gttacaagtI catattgtctI attaaaaa gttagtgag  
agctcagtaa atgtttatI aatagataaa tccatgggtI tagctatgatI cattgacataI atatgtctccI tttaggaaggI tggatctca  
aaaatgtgtI aatcaggtggI aatgtttgtI cacatgtcaI ctgttctcaI ctctagattaI ccgttaaacI cccatgttaaI gaaaagcctI  
taaagctgacI attcctaaatI tctgtcacggI tctctgactI aaggccaaggI atgattcagaI attagaaggaI caagctatctI ctgtcctgaaI  
gtgagataI gctgaccagcI gctgtctcI agactgtgaaI gaccagatccI gaatcattatI ccaggagtcI gccctggactI  
accgctggaI tctcagctcI cagctgactI gctcagacgaI ggtgggattI gcgtgcaaaaI ctggttacgcI acagagctgcI  
tcagagaagI ttccactggaI gaaaagtgtI ttacttctcI tccctcagcI cgtgaatgatI ctggtagaattI gaaggccatcI tctaggctcI  
tccatggctI gcatctctgtI tctttgtaacI actgaattcaI acttggcattI agtctgacaI ctctaaagcgI ttgtccataI tttctgttI  
gaacaagggtI gttcttcatI tatagctctcI tgaattttI ttctccctI ctcttattcI tggatgtaaI acccaagaccI tccagaaaagI  
ataaaagtgcI ttcagctggI gcacgggtgcI tcacgctgtI aatcccaacaI ctttgggaggI ccaaggaggI tggatcatctI  
gaggicaggaI gttcaagaccI agcctggctaI acatggagaaI atctgtctI actaaaaataI caaaaaattaI gccaggcgtI  
gtggcgtgcaI ccagtaatctI cagctactcaI ggaggctgagI gcaggagaatI cactgaaccI cgggaggcggI tggttgcagtI  
gagctgagatI catgccactI caccaccagcI tggcgacagI aggaagactI tgtctcI

Figura 8G

MQTEDIRLEPDLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETE  
MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQIT  
QNTGKILAWLSWPRGVSEKEFSGCRVTCNSQGFVAWEF

Figura 8H

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt cctgaggat ggacacttct cacactacaa agtcctgttt gctgattctt ctgtggccc  
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgttacca gtgctatgga gtcccatttg agacttctg cccatcaatt  
acctgcccct acctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa  
caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtaacgtg aagacttctt gttgccagga  
agacctctgc aatgtagcag ttccaatgg aggcagcacc tggaccatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag  
tctctctgca gacctgtctc tgalggctct cccaatgacc tccaccttg tctttttatc ctcatgtgca acaattctc ctggagccct  
ctagtatga attatgagt atagaagctc caaggiggga gtagtgtgtg aaalaccatg tttgccttt atagcccctg ctgggtaggt  
aggtgtctta atctctcta gggctttcaa gctgtactt cctagaatgt cattttgtt tggattgctg ctcatgacct tggaggcaca  
cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatccat .ccacacataa gtatctgggg tcttgaatg  
ttcccatg tctctgaat gtcccctgt tgalccaat aaacctttg ttctcccaa aaaaaaaaaa aa

Figura 9A

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV  
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG  
VLLFSLSSVLLQTL

Figura 9B

atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga tggacacttc tcacactaca  
 aagtcctgtg tgcctattct tcttgtggcc ctactgtgtg cagaaagagc tcagggactg cagtgtctac agtgctatgg  
 agtgccaatt gagacttcti gccagcagt lacctgccgc gccctgatg gattctgcat tgcctaaaac atagaattga  
 ttgaggactc tcaagaagg aactaaaga cccgtcagtg ccttcttctc tgcctgtctg gtgtgccaat cagggatcct  
 aacatcaggg agaggacttc ctgtgcagc gaagacctct gcaatgcagc agttccact gcaggtagca cctggacat  
 ggcaggggtg ctctgttca gcctgagctc agtcgtcctg cagacctgc tctgatggc ctccaatga cccccacct ttctctta  
 tctcatgtg caacctcti tcttggagt cctctagtga caaattat gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc  
 ctgttacc ttatagccc ctgctgggta agtgcccagc tctctctag gcttcaaa tctgtacttc ttgcaatgcc attagtgt  
 ggattctat tcttggcct ggaggcatgt gccagcaca tgaacaggc agtattcaa ggtattatag taccaccatc  
 cacacataag tcttgggggt cctgcagggt tccatgtat gctgtcaat gaccctgtt ggtccaata aaagcttctt tctccagcc  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa

Figura 10A

MDTSHTTKSCVLILLVALLCAERAQGLQCYECYGVPIETSCPAVTCRASDGFCIAQNIELI  
EDSQRRKLRQCLSFCPAGVPIRDPNIRERTSCCEDLCNAAVPTAGSTWTMAGVLLFS  
LSSVVLQTL

**Figura 10B**

gcccacccc gccagcccg tgcctalaag gccctggcaa tgcaggggcc cgcacigctc ccagacgaca tcagagatga  
ggacagcatt gctgctcctt gcagccclgg ctgtggctac agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt glgcaccage  
tccagcaact gcaagcattc tgtggtcigc cgggccagct ctgcttctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag  
ggggaatcig gtaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca cccagctaca cctgcaagg ccaggtcagc agcggcacca  
gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa gctgcacaac gctgcacca cccgcaccgc cctcggccac  
agtgcctca gcctggggct ggcctgagc ctctggccy tcatcttagc cccagcctg tgacctccc cccaggggag  
gcccctcatg ccttccctc ctttctctg gggattccac acctctctc cccagccgca acgggggtgc caggagcccc  
aggctgaggg ctccccgaa agtctggggac caggtccagg tgggcatgga atgctgatga ctggagcag gccccacaga  
ccccacagag gatgaagcca cccacagag gatgcagccc ccagctgat ggaagggtga ggacagaagc cctgtggatc  
cccggattc acactcctc tgtttgtg ccgtttatt ttgtactcaa atctctacat ggagataaat gatttaaacc agaaaa

Figura 11A



MRTALLLAALAVATGPALTLRCHVCTSSSNCKHSVVCPASSRFCKTTNTVEPLRGNLV  
KKDCAESCTPSYTLQGQVSSGTSSTQCCQEDLCNEKLHNAAPTRTALAHSALSGLALS  
LLAVILAPSL

**Figura 11B**

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggltcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gccgggcgag  
 caggacaggc tgciltggtt tgtacctcc aggcaggacg gccatccicl ccagaatgaa gatctcttg ccagtctgc  
 tggctgccc tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttcc tgcitgaacc agaagagcaa tctgtactgc  
 ctgaagccga ccaictgtc cgaccaggac aaclactgcg tgactgtgc tgcitagtcc ggcatggga atctctgac  
 alftggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatccag aaggcgtcaa tgttgggtg gcttccatgg  
 gcalcagctg ctgccagagc ttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgtgggt  
 gccgggctgc tgcitgacct gctgccggcc ctgctcggt ttggcccctg accgccaga ccctgtccc cgatcccca  
 gctcaggaag gaaagcccag cccttctgg atcccacagt gtatgggagc cctgactcc tcacgtgcci galctgtcc  
 ctgggtcca ggtcaggccc acccctgca cctccactg cccagcccc tgcctctgc caagtgggccc agctgcctc  
 actctgggg tggatgatg gacctcctt gggggactgc ggaagggac agggctcc tggagtcttac ggtccaacat  
 cagaccaagt cccatggaca tctgacagg gtccccagg agacctgtc agtaggatg tgtgcctggc tgtgtactg  
 ggtgtcagt gcactgaga gcacgtggc gcttctgggg gccatgttg gggaggagg tgtgccagca gctggagag  
 cctcagtcct tctagcccc tgcctggca cagctcatg cactcaagg gcagccttg ggggtgggg ttctgccac  
 ttccgggtc aggccctgc caaatccagc cagtctgcc .ccagcccacc cccacattg agccctctg ctgcttgg  
 gctcaata aatacatg tccc

Figura 12A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL  
VTFGHLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL  
SLLPALLRFGP

**Figura 12B**

actgtcctg caacctggtc agagaggaag taaggactgg tgcaggagg gagctgctag gttgatctg tgcagccctt  
 ctccaaggat ggacagtgt cacactaaa agtcctgtg actcatcctt ctgttggtcc tattgtgtgc agaaagagct  
 caggggctgg agtgctataa ctgcctggga gtttacttg gaattgcctg caaatcaatt acctgccctt accctgatgc  
 agctgcatt tctcagcagg tagaacttat tgtggactct caaagaagga aagtaaagaa caaactctgc ttctcttct gccctgctaa  
 tcttgaanaa atggagatcc tgggtactac tgcacactg aatcttctt gttgcaagga agacctctgc aatgcacat ttccactgg  
 aggcagcacc tgcacatga caaggggtct tctgtaaat ctgggtcgg tcttctgca gacctgctg taaaaggctc  
 tccaaggac ctccacctt gttgtttat cctcattgc aacttctt tcttgagcc ctctagtag gaattatgag atattgaagc  
 tccaaggctg gagtagtgt tgggaatac gttgttcaa ctctatagcc cctgctggt aatgcccc ctctctca ggaattcaa  
 atatgactt cctagaatgc cttttgtg tggctgcta atctggccc tggaggccc tggctagcag agggtagagg  
 cagaatcca aggtattaag ccatcaccat ccacacataa gtgtctgagg ttctgcagga ttctatgta tgcggctta tgcctctg  
 ttgactcaa taaccttt gtctcc

Figura 13A

MDSCHTTKSCVLILLVVLLCAERAQGLECYNCLGVSLGIACKSITCPYPDAVCISQQVELI  
VDSQRRKVKNKLCFPFCPANLENMEILGTTVNVNTSCCKEDLCNAPFSTGGSTWTMTR  
VLLNLGSVFLQTL

**Figura 13B**

ctgcagccag gctgagagg aagtaaggac tgggtgcagg agggagctgc taggtgacaa agggaagaac cctcaggata  
gggctgiggf gggagtgaga ltaggaaaga agagctgggt ggggtggtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca  
gggaaagctg tgtagagggf tggagggagg gaatattgga tgyctgagcc gtgtgagagc ccaggggtgt gatcaggggt  
ctattaactg gctccaactt ccaaggttt atctgtgcag ccttctcca aggatggaca ctctcacga gataaagtcc tgtgtctga  
tcttctgt gaccctactc tgtgcagaaa gagctcaggg actggagtgt taccagtgt atggagtccc atttgagact tctgccc  
catttaccg ccctaccct gatggattct gtgtgcica ggaggaagaa ttattgcaa actctcaaag aaagagagta  
aagagccgtt ctgcatcc tttctgccct gatgaaattg aaaagaagt tctctggat cctaacacca agatgaatat ttctgttc  
caggaagacc tctgcaatgc agcagttccc actggaggca gctctggac cacggcaggg gtgcttctgt tcagcctggg  
ctcagcttc ctgcagacc tgatgtgat gtcaccacc

Figura 14A

MDTSHEIKSCVLILLVTLLCAERAQGLECYQCYGVFPFETSCPSFTCPYPDGFCVAQEEFI  
ANSQRKRVKSRSCHPFCPDEIEKKFILD PNTKMNISCCQEDLCNAAVPTGGSSWTTAGV  
LLFSLGSVLLQ TLM

Figura 14B

gttatcagag gtgagcccgt gctctcagc ggagaagatc cctacctgg ccgccggcca cttctgtgg gccgtgggg  
 ccicaaggag acggccctg ggctcagggg ctgcyttcc acacgcgct tcccagggc lccgcgccc gttctgct  
 ggccgcccgc cgtccaaca gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggccgc cagcggccgc gaggccctga  
 gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggccgggtggg aggcgcgcgc cccggggcgg gcggggctcc cctaccggc  
 cagacccggg gagaggcgcg cggaggctgc gaaggltcca gaaggcggg gagggggcgc cgcgcgctga cctccctgg  
 gcaccyctgg ggacgatggc gctgctgcc ttgctgctgg lctggccct accgcgggtg lggacagacg ccaacctgac  
 tgcgagacaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gagggtgaca atagagtgtg gtgtcatgtt tgtgagagag  
 aaaacacttt cgagtccag aacccaagga ggtgcaaag gacagagcca tactgcgita tagcggccgt gaaaatatt  
 ccacytlll lcatggtgc gaagcagtc lccgtggtt gtcagcgt ggagagacc aagccagagg agaagcgggt  
 tctctggaa gagccatgc cctcttta cctcaagtgt tgaataatc gctactgcaa ttagagggg ccacctatca actcatcgt  
 yttcaaagaa talgctggga gcatgggtga gagctgtgtt gggctgtggc tggccatct cctgctgctg gccctattg  
 cagccggcct cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgacct tccggagcat ggactcgtc cagaccgtg  
 tcactgttg cattaactt gtttctgtt gattacctt tggttgact tcccagggc ttgggatggg agagtgggga tcaggtgag  
 ttggcttta acctcaagg gttctaac tcacalcag aggaagcca gatctctga gtagtgattt tggtgacaag ttttctt  
 tgaatcaaa cttgtaact cattaltgc tgatggccac tcttctt gactcccctc tgcctgag ggctcagta ttgatggga  
 gggaggccta agtaccactc atggagagta tgtctgaga tcttccgac cttcaggtg acgcaggaac actgggggag  
 tctgaatgat tgggtgaag acatccctgg agtgaaggac lctcagcat gggggcagt ggggcacag ttagggctgc  
 cccattcca gtggtggagg cgtgtggat ggctgttt ccacaactt lctaccaga tccaggagg cagaagataa  
 ctaattgtt tgaagaaact tagactcac ccaccagctg gcacaggtgc acagattcat aaatcccac acgtgtgtt tcaacalcg  
 aaacttaggc caagtagaga gcatcaggtt aaatggcgtt cattctctg ttaagatca gccatcatg gggagctgag  
 aatcagact caaagttcca caaaaaaa atacaagggg acttcaaaag ttacgaaaa aattgaatta aaagataaaa ataa

Figura 15A



MRLQRPRQAPAGGRRAPRGGRGSPYRPDPGRGARRLRRFQKGGEGAPRADPPWAPLGT  
MALLALLVVALPRVWTDANLTARQRPEDSQRTDEGDNRVWCHVCERENTFECQNP  
RRCKWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQCSAGCAAMERPKPEEKRFLEEMPPFFYLKCC  
KIRYCNLEGPPINSSVFKEYAGSMGESCGGLWLAILLLLASIAAGLSLS

**Figura 15B**

ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agalacacag ccagtgatgt ggaccaccgg atggctgttg  
 ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctggagtgctacag ctgctgtcag aaggcggacg atggatgctc  
 lccgcacagg atgaagacagtcaaatgtgg tcccggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta  
 gagaccatccacgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgaccgcggactgga  
 ccttcacggg ctctggcct tcttcagct acagcagtgc tccgaggaccgatgcaacgc caaactcaac ctacattgc  
 gaggcctcaa ccctgcaggc aatgagagtgcatalgagcc taacgggtgca gactgtaca gctgtgtggg tctgagccgc  
 gagaagtgccagggtccat gccgccgtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgc tacaagggtgcttcgatgg  
 taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtccta cctgtccgaggctgcgtcca ggacgagacc tgcaccggg  
 atggggtgac ggggtccagga ttacactcagcggctcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tgcacaag  
 acctattctccccgaat cccacccta gtctgtgctc cccctcaac caccgcagcc ccatecactcgggcccagaa  
 ctctccagc acgacctta cagcagcccc aaccagacc acctccatcatcaagcccac cacagccaa gccagccaca  
 ctctccca tgaatggat ctgaagtcatacaggaaga gggggcgctc ttgagtggag gtgtgctggg ccatggaggt  
 actgcgggccatggaggtgc tgcgggccac caagaccgca gcaatatgga gaagtalca ggaaagggtg gggcccagat  
 cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtctgtgtg tctgcagttc tgtgactgt ggtgtctggc gcgatctgt  
 gaatgttca tctgaaaag tcatctcac ttgttccc tggccccgtg gtaccaactc ttccattc tcaattgact ggactggctc  
 cggccccatc ctacagcatt ctagttccg actgcactgg ttgcagctt cggaaaacag tctctgttg taaatattc gctcgggtgg  
 cctactttt ttgatcggc cacagcattc cccctgatgg tgaccaggac agagggaaga gacgtctact ggtgagaga  
 ggcccagaga gtccacggca agcctcctct tccglttct ctgaccaggc tggagatga ccaggcaggt agacaatgga  
 tccatctcc gagcactgtg ctgacctggc acattgtgcg gaaatctggt cgcctgtct ccttaggaga ctgtgaaca  
 ctciacaaca gggcttctc tctggcctct ctatgttct tctgtggcac aggaaggtgt caataaagat ttgattact tgalagtga  
 gtaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

Figura 16A

MDAARRGDTQPVMWTTGWLLLLPLLLCEGAQALECYSCVQKADDGCSPHRMKTVKC  
GPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSVAVRGC GSGIPGKNDRGLDLHGLLAFFQLQQCEDR  
CNAKLNLT LRGLNPAGNESAYEPNGAECYSCVGLSREKCQGSMPV VNCYNASGRVY  
KGC FDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDETCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGPRCNADLRN  
KTYFSPRIPLVLLPPPTTAAPSTRAQNSSSTTSTAAPTTTTSIKPTTAQASHTSPHEMDLE  
VIQEEGASLSGGAAGHG GTAGHGGAAGHQDRSNMEKYPGKGG AQP AKGGSGTLGSW  
LSAVLLTVVAGAML

Figura 16B

tcgctccccg cgccgtgcc gccgctgagc ccggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc gccccagagg acccccgcct  
 gcagccccg cgccctcttc aggccctatc ggagcatgctgcctgcagcc atgaagagcc tcggtctggc gctgctggcc  
 ttgcttctct gccctcgcggcccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt  
 gcgctccgaagcagtgccag cccaccgata ccgtttgtgc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcagcaggaaggat  
 cattctgtga acaagatgtg tgccttctcc tgcgacttcg ttaagcggcacttttttca gactatctga tggggttcat taactctggg  
 atctaaaag tgcacgtggactgctgcgag aaagattgt gcaacggggc atcggctgca ggacgcagcc  
 cctgggccctggctgggggg ctcctgctca gccctggggc tgcctctc tgggctgggc ctaagacccctccctcct  
 ccctctgggc ttggagctt gtcccctaag cctgtgtctg ccctcccagcctggcctg gctggggctg ggacagcaag  
 gglttggcat caaggctga ggctcaaccctcctagat gtgagtgagc ctctccgtt tctccaccag ctccatatc  
 caagcagctgaatatctcca ggagtccaga calcctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggaaggactga  
 gacctccag gctccaagg ggaggagggt caagccaggg acagccaacagcctggcct gaggggcatt aactacagag  
 aaataaagtc actctgagt cttgtgaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

Figura 17A

MPAPQRT PACSPRASFRPYRSMLPAAMKSLGLALLALLCPSPAHGLWCQDCTLANSSH  
CAPKQCQPTD TVCASVRITDPSSSRKDHSVNKMCASSCDFVKRHHFSDYLMGFINSGLK  
SRRGLLRERFVQRGIGRRTQPLGPGWGAPVQLGAWLFFGLGPKTPPSLLVGFGACPLSL  
LVPLPSLAWLGLGQQGFGIKV

Figura 17B

agaagaggcg agactttttt ggggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag ccaactcctc cggaggcgct  
 gcgctccgcc ccaggagcg cgaatccaag gagcctgggaccagcctctg ggagcccccg gcgcggggca tgcgggggcc  
 gcggggcaca cctgcggctcctcctcgggtgg cagccgtcgc ttgggcggca gcagcggag cctcggcagc  
 ctgagcagctactgtcggc cggccagaac agcctccgct gcggctcgtg tctctgatgc tctgcccctcccggcct  
 gccgatccgg gaggatgtg gttctcggca tgcagcaac ttttgcggattgttctggc ttccagggtt ggcgtgcaa  
 attcagtgct accagtgta agaattccagctgaacaac attgctcctc cctgagttc atcgtaaatt gcaccgtgaa  
 cgttcaagacatgtgtcaga aagaagtgat ggagcaaagt gctgggatca tgtaccggaa gtcgtgtgcatcgtcagcag  
 cctgtctcat tgcctcagct gggatccagt ccttctgtc ccttgggaaactgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac accctctt  
 gcaatgggcc gaggcccaagaagagaggca gctctgcctc ggccatcagg ccagggttc tcaccactct  
 cctgttctccacttagccc tctgcttggc acactgctga agctaaagga gatgccaacc cctgtgcctcactgtctg gccttctc  
 tctcacttc cagactctc tctgggtgtc ctttattctgggtagacaa gggagtctt ttgtccctc cttcaagta acgcaagatt  
 gccgtgcacaaaactttt taagctctga accaattcat tctgaatttc tgtgtgtagt tgaagaaaaagcatggagc agaaagtcca  
 gacctcca tccaactg gtaaccacc gccaaggcta gctggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacga  
 tctgcttcc ccaaagcctt gagcttccat tctgtcccag taggagtcac agtctattca gagactgctg ctgctggaag gtaactttgc  
 tttgcggga ggggagagcc agttcggct caaggcttct gaactgcca tctacttc ctgctctgt aaactattt ctgggtgga  
 cccagctggt ttgtctctg agccagtctg tggtagtca ggactcaagg gctggggctt agccttcca ggcttggct  
 cagtctgaaa agtgccttaag aaaacctgt tagttctct ggaggaagag ttactgcgc gggaggctag gaagatgagg  
 gggctcggg ctgagctggt gctgtcctt gtagatga agcgggcacg ctggcgttc tcttgggtg catgctcag  
 agtcaggcgg cagcagagca cctgccagaa caccttccgg aactgctgag aggacacgtt gtagaggaga ggggtgacca  
 cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt acgttctggt ccagtcatgt  
 ttgggtttg ctgagccat gatccgtcgg atctgattgg gcatccaaca cacggccaac gtcaccaca ttagtcttgg  
 caggcaagaa caggagagaa aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa cccataaaat  
 ataaagccc ttggttctgt tgcctactgg ccgagaaacg gtaccaatct ttacgtctg tgccttctgg cttctttt cactggcaa  
 aggagaattt aatgctgctt caagctcagg ggacttggct atgtaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtattata cttacggctg  
 cctgtaatt tcaaaatgt ttcaatgtt gctcgtgtat ccagaaaata tctcacgtt gccaaaa

Figura 18A

MWVLGIAATFCGLFWLPGLALQIQCYQCEEFQLNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV  
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSGKLNVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA  
SAIRPGLLTLLFFHLALCLAHC

**Figura 18B**

ggcaggcctg agtgaggacc tcgacatgc aggggacctg gatggtgctg ttggcactga tattgggcac cttcggggag  
cttgctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaalccctgtgagtgcac caactgtgc accaccacc actgccacat  
caatgaaacc atlgcaagaactacgcctc cccctggag attgtttcc ctttcctggg ggactccacg gtgaccaagtctgcgccag  
caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgtcctgctgcaa ttctgacctg tgaacgtgg  
atggggcacc cagccctggc agtcctgggtggcctgctcct tggcctggca ctttcttgc tcttgggtgt cctgctgiaa  
agccatggccatctagctc actccctgt ccctgacac ccagtccct aatgcctaga agaaatacaatggccatctg  
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

Figura 19A



**MQGTWMVLLALILGTFGELAMALQCYTCANPVSASNCVTTTHCHINETMCKTTLYSLEI  
VFPFLGDSTVTKSCASKCEPSDVDGIGQTRPVSCCNLDLCNVDGAPSLGSPGGLLLALAL  
FLLGVLL**

**Figura 19B**

atgctttta tggcaggccc tgcagccagc tggccctga ggcccctggg acatcatggc gtccccaag ccttgtgtgc  
tgtccictta acagtgtcgg tcatgaagac ctgggtctcgggtatacca agctcgagga ccttcacctc cagtcctcc cactaaaca  
gtacctgaaltgctaccgat gctgtctgga gaccgaagag ctgggggtgcc tccgggggtc tgacacctgacctgacacctc  
tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggttttaatgcatggta gcgactgcta cagcaaggag  
cagatggicc attgtcata taccgtgcttccccgggtg ttggctttg gatattctat cagtgttct tcctggatt  
ctgcaacaalccggacaaca gaaagaatag catgcactag

Figura 20A

MLFMAGPAASWSLRPLGLHGVPQALCAVLLTVLVMKTLVLGDTKLEDLHPQSLPLNKY  
LNCYRCLLETEELGCLLGSDTCLTPLGSSCVTLHIKNSSGFNVMVSDCYSKEQMVHCSY  
TRASPVFGFWIFYQCCFLDFCNNPDNRKNSMH

**Figura 20B**

agagctggag accigggaaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgggacatt ctgaggacc tcacatgaa acacctctg  
 ttgctcacc ttgctgccc acctactgc tgggtctcagctgatactg atgtaactcc tctacaaaag tccctgtgtg gggctgtgtg  
 gatgccagtcctgccgct ggagccgggc cacaaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt ggaagatgtgggtttctc  
 taacctgcg cgcggcacac cagaagagcc ttgctggggag gcttcaacgaaaccaacca taagctgggc ctgaactaca  
 acaccacctg ctgtgacaag gataactgtaacagcccggc tccacggccc acaccgcaac tggccctcat ctccctcacc  
 tcttggctggcctcggcct ctgggtattg cattgagact agctccatgg ctacaatctt accacctgctatagcctgag cctttctcc  
 tgttctca gagctccagc ttccagaat ctctctctctcccacccct tcttctgaag atcatgtccc tagtctata ccatttatt  
 catgggactgtacctggagt ggcctttcta gccaccgctc ctctccctca ctgtcacct tccactccattccaccaca cacagacaca  
 cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacacacacacaca cccagtcctt tccatttc ttctagaaca  
 ctctacctc tccactggccactgaaaggc tccctcctt ggacgcacac tgtgtgct ctgggatcta agctggaagaactcctgtc  
 ttgctccag ggagtgatc caaaaggcg tggcctcatt gcatgggcttggcttaccag acctctgt tctccctc taactgaga  
 aataaacatc agtgtctaat

Figura 21A

MKHL L L L L T L S A L L Y C W V S A D T R C H S C Y K V P V L G C V D R Q S C R L E P G H K C L T T N V Y L G K  
M W V F S N L R C G T P E E P C R E V F N E T N H K L G L N Y N T T C C D K D N C N S P A P R P T P A L A L I S L T S  
L A G L G L W L L H

**Figura 21B**

gcctacttgg cctgcctcgc atgcggctacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca gttagacagc aggagggacc  
 tgggagcggc cagggggatg tttatctct aagagaccaagagctcaggc agggctctg tgcctgctt cctccctggc  
 ttgagcttga tcttgaccagctgctgacc tctgttccac tctggcactg cctcaccgic tccgtcatga cccatctgctcacagtgtc  
 ctgggtggcc tgalgggctt gcctgtggcc caggctctgg agtccacgtgtgtccctac aatggagaca actgcttcaa  
 acccatcgc tccccagca tggccacctactgtatgacc acacgaactt acttaccccc ataccggatg aagggtgagga  
 agtctgtgtcccagctgc tttgaaaccg tctacgatgg ctattccaag catgcatctg ccacctctgttggcagtac tacctctgca  
 acgglyctgg ctttgcctacc ccgggtgacct tggccctgggtcccagcactc ctagtacct tctggagctt gctgtaaagc  
 tgggttcccc aagccagatccactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctcccaat tcactccaccaacgctctt  
 ccttctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaagaactgatggc atccagatac ctacctccaa ggtcatitc  
 agaaggtctga catgtggacctgtaatgtc ccaccatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctaccca  
 agatcaggggcatctgggag aatgttatg gaggaggggt cactactcaa gtcaaggagc actgatttgatagaattagt  
 agccaaact cacttccaga accctgcctc agtctaccca gtagaggatgggtctgctag aggtgagggg aggagagcgg  
 cggagaataa cgagctggct agaagcagag aaagactcag cagggtctgc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa  
 atgtgatgtg gaagccatgt gaggaagccc ttgtcattt ccacttactt gaggaactct gccagacctg atgttgggat  
 agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcatttcca taggccactg aaatccctcc agccccagct cagcagggccc  
 ctgacctcc actacagctc ttacttca caccagctgc tgggcttga agttggcagg gacttgggag cagggtgacc  
 atctattt ttgtctggcc tgttattctg ggcatggcaa gaaggatca gacgcaggtc agagcagggc agtagggcga  
 ctgagacagg gaaacagact tcaaccagtg gcttcccagg tcccgtaggc agctctaca tcttccagtc tctgttaca  
 tccccgggag acaaatatc agggagccaa gccgagtctt aggtgatgac tgcctgtgaa gctctattgt gccacagact  
 gctgggtacc aagtctcagg agaaccagc ctgatttag gagacacaga tctgccttc atgcagtga gctgtccttg  
 ggagcctac catgctctt aactagtacc tcaactca tctcactgag gaacccccia aactggccc agcccagggg  
 tgggatgct ggccaatgt catggagtgg gactacccat ggagagtctt tgggtcatca cactacaaat gttttattcc  
 aacctccag tggtagagc tgggacaca aaggctcctc ctggggacct tcttctggt tctaggcaga cctgaactct  
 gctgctgct agagctgat tggtttccg cctcagttc ctctccggg gataggccac cggaggattt gggaggggtg  
 ggagggcact ctgctgatg gctcggcag gttctcagga acaggaacgg gcggggcttt agtacacagg ttagttgggt  
 gggaactggc ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggagatga gtcctcaagg agggcaggaa aaggagggg  
 gagcgcgat gcacatgtc actcagtca ggctacagag cccaaaaggc agcactggct gtgggttccc ctgaggccca  
 gcaagatgc taggaggaag ccaatgtctc ccccactga gtcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag  
 cttgagact gacctgtgga cggcataggg cactggcaag gagggctcaga ggcgggtccc tgaictcagt ggtgagggccc  
 gggaacatt atctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagct

Figura 22A

agatggcgtc ctcaacaaa actgagagga gccccagttc aggtccctcc tctaccaca aggggggtgt gtggaggagg  
 cltgaltgcc ctggagaag caccggtact gcagagctgg gggccagctt ctltcatctg tgtctagaca ccgaccagat  
 aggccccaca gtggcaacac tggcacacag ccctacaaga agccctgtgc ctagctagca cagagcccca aaaggtgctc  
 aaltaataca gggccaagcc tggcagtggg ggggatgcag attaggggaa cagaccaga tggcctgtcc tgaacctgt  
 ctgggggtgt gtgatgagca tctgtctagc cactgcagg tggctctaca cactccaca cagtctgca aaagtgtatg  
 aggtggtcat tactgcgccc ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgaggc acttcattt cctgggcat  
 tcaacttcc aggaccaaca cattcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttctt gaggctgggc cccctgaaga  
 tgatagtggc tcatcaacc agagaattc agagtgcagt gttgtaggag cctatgaacc tgaatgtca gaactggagg  
 ttgagggggc tgaggggtag gccaggggtg tctggccct tgtgtggaga cagagagaga gggaaatgg gatgggtag  
 tagagagaag tgcaaaggag cgtcagcctt tctcagggt aatgtgtca gggacgaggg ctcaagcctg tgagtgtct  
 cacactgtga laaacagtgg cccctcaaca cagacggtgt ccagagtggc cggcagtgt tatctagagt tcaatctgg  
 aagcctctg gtagtcactg gagagaggcc gcttgatggg acagaccaa atgtgtgtc ttctgtgga tgtgaggaag  
 ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtct tcaagcaga ggggtggctg gtctagcca ccagagaca gctatccagt  
 gagagcata ctctgccacc gtctctgtga ttacctacc ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtct  
 catctctgc ggcaagcac tgagttcaca ttctgaaact ctgaaaagat ttccaggagt ggggtgtgcc ttgctttgg tcatggta  
 ctcttgga agcaccgtgg catcccag cactgagtga cctgggtcc tcaagccalc tcatggga aatgacagt  
 ccagtacct ctacgtggc tctggaggc ctgtcatgg ggtctgcaca gaggaggccc ccaaactatg catggacgga  
 cagtgatgc ctgacttc cctgggtgt gtctgtcca acccaggct ctacccagc aaggaaatga aatccattt  
 latgacacat cccctccc cagccagct cattaccta tatccaggg tggccctt caatgtctgt ccccatgg atgaataac  
 aagcgaagga ca

Figura 22A (continuación)

MTHLLTVFLVALMGLPVAQALECHVCAYNQDNCFKPMRCPAMATYCMTTRTYFTPYR  
MKVRKSCVPSCFETVYDGYSKHASATSCCQYYLCNGAGFATPVTLALVPALLATFWSL  
L

**Figura 22B**



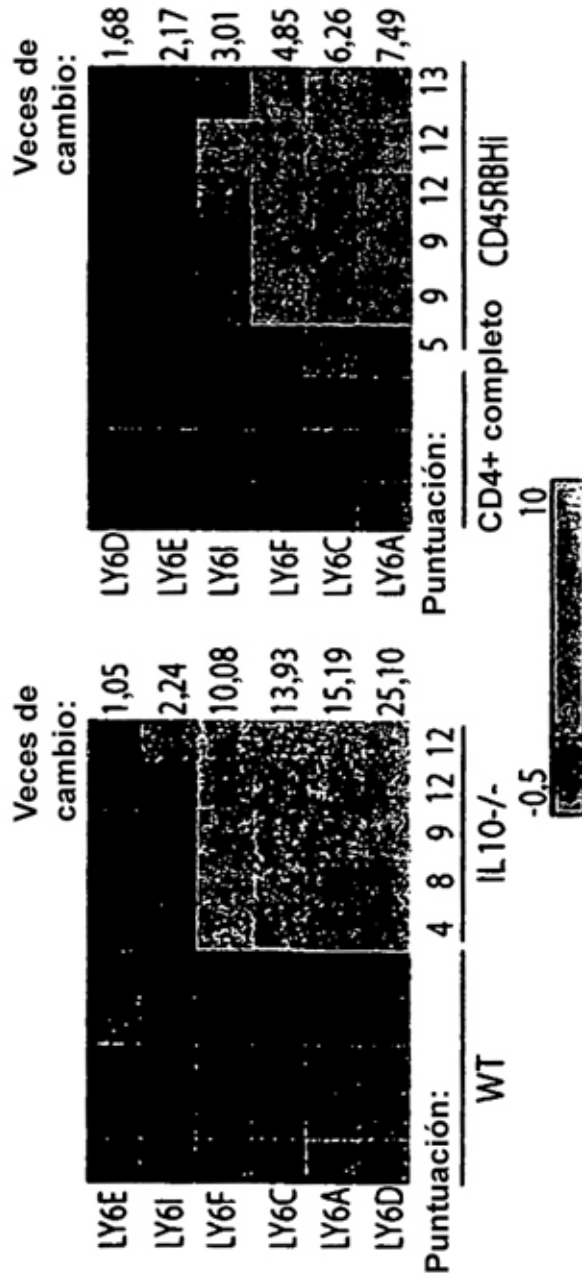


Figura 23A

Figura 23B

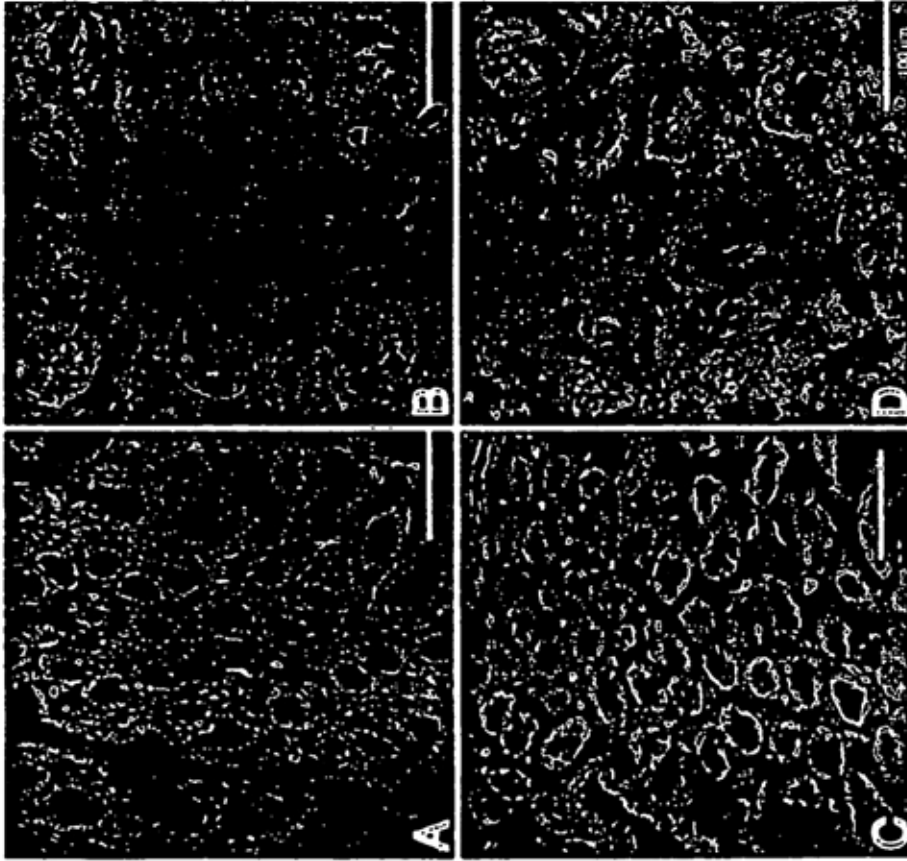


Figura 24

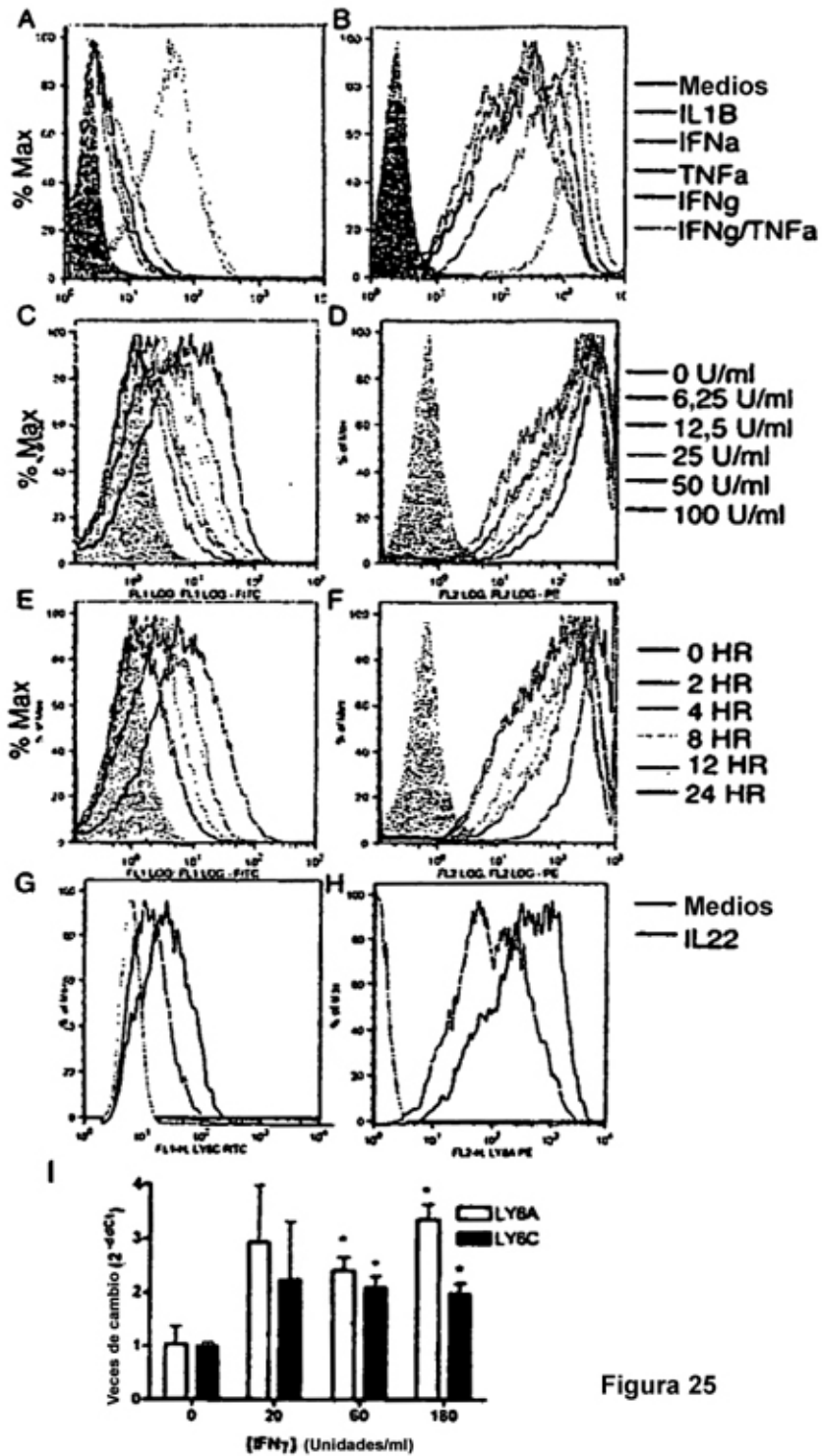
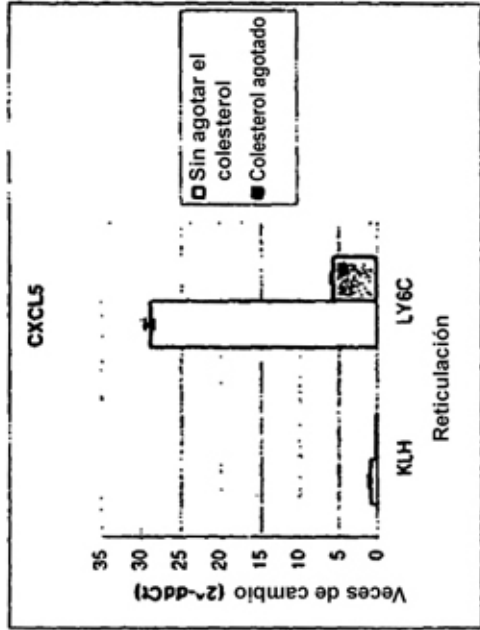
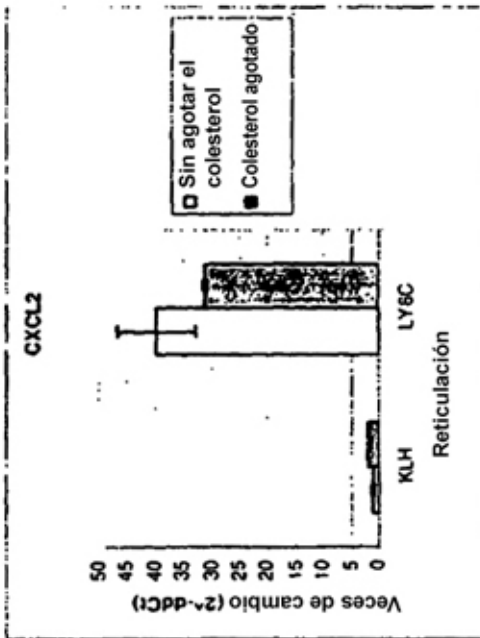


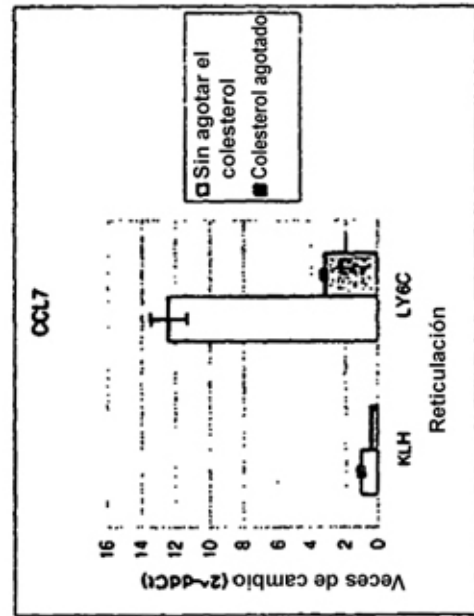
Figura 25



B



A



C

Figura 26

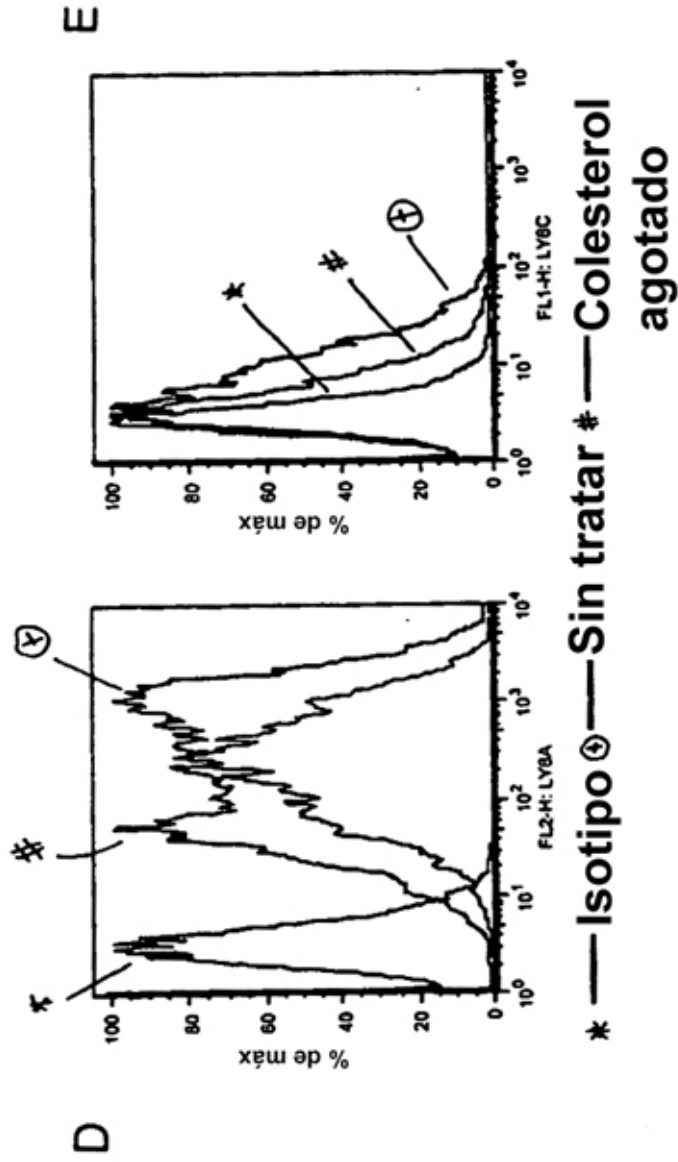


Figura 26 (cont)

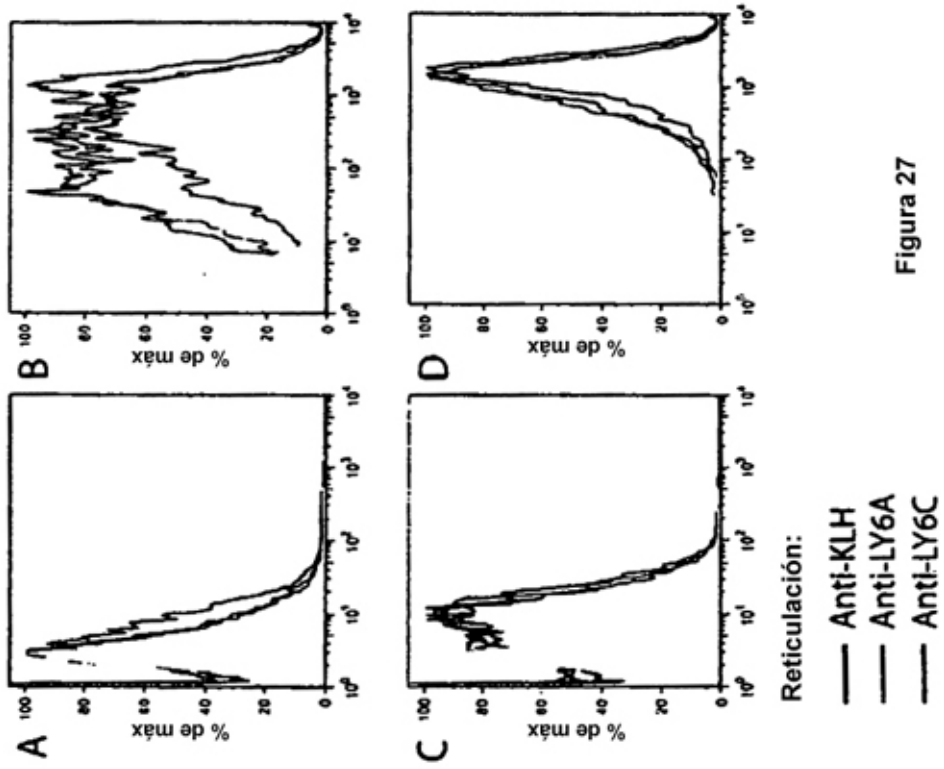


Figura 27

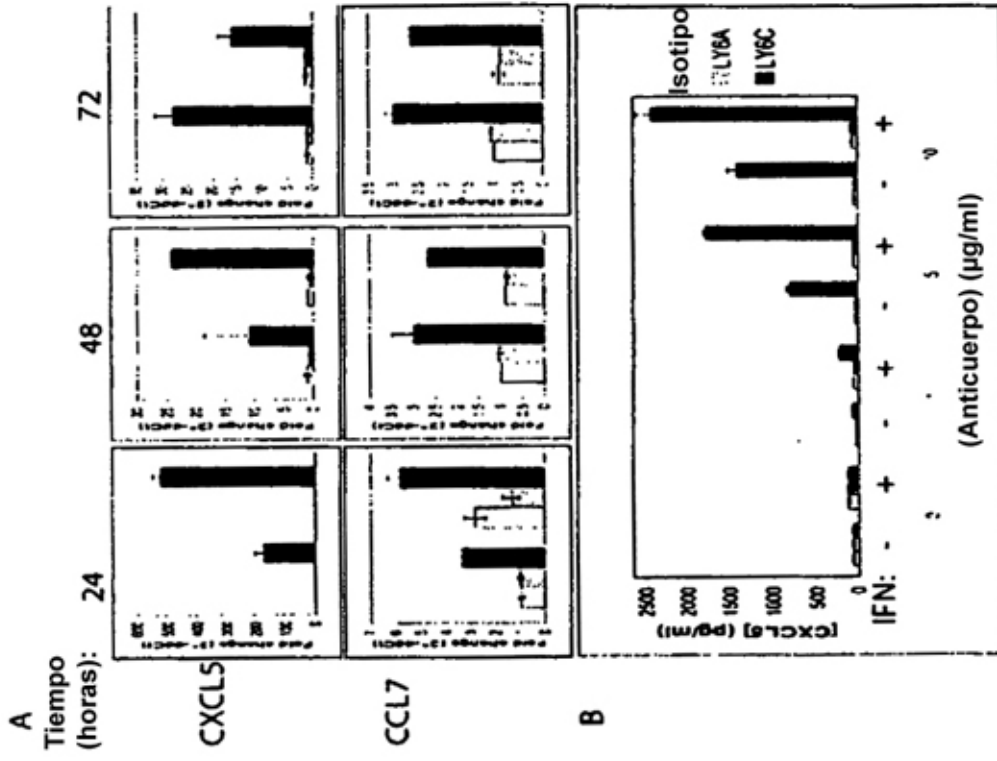


Figura 28

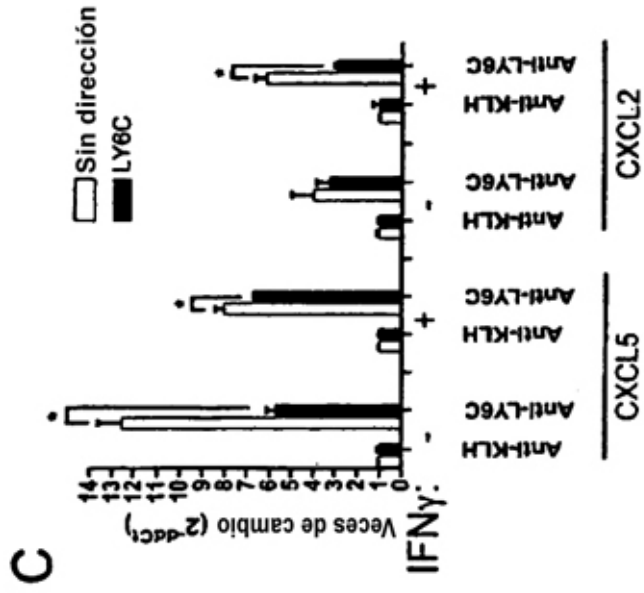


Figura 28 (cont)



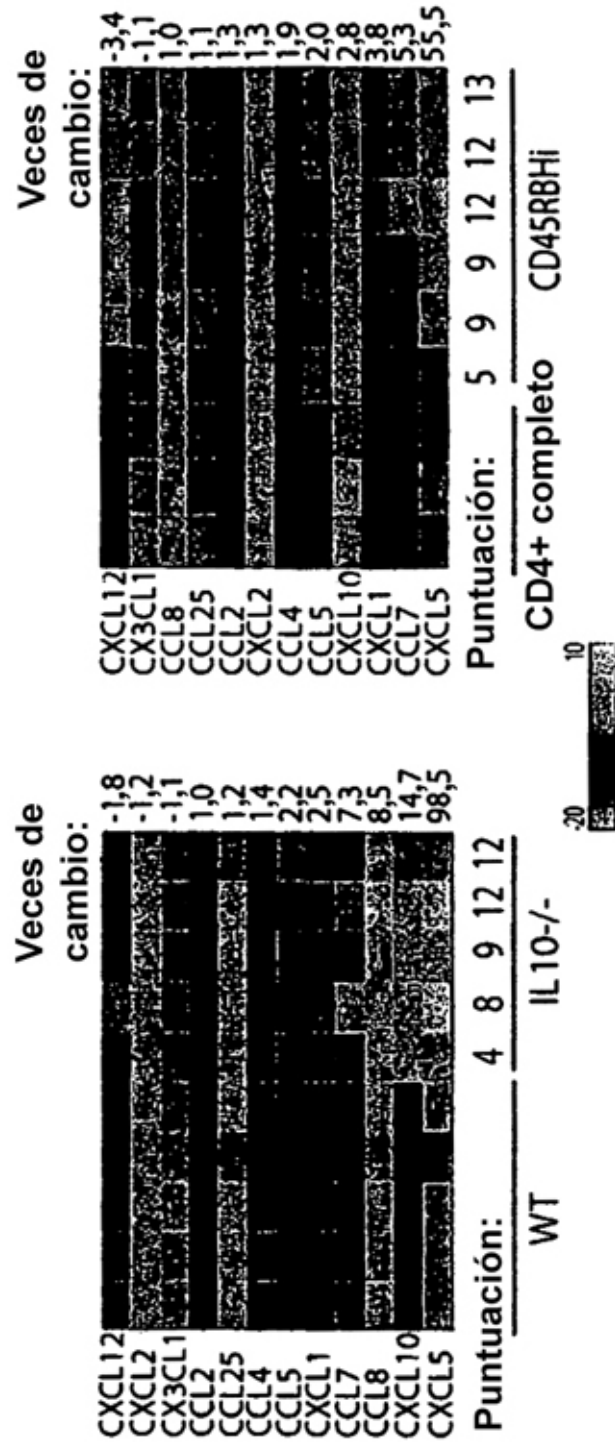


Figura 29B

Figura 29A

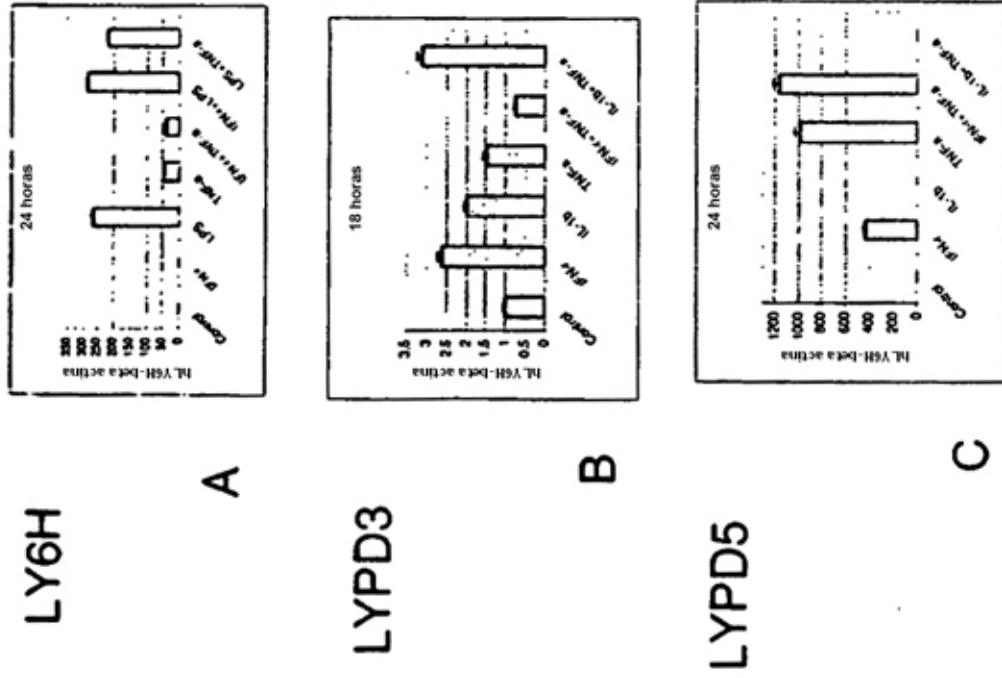


Figura 30

# LYPD1

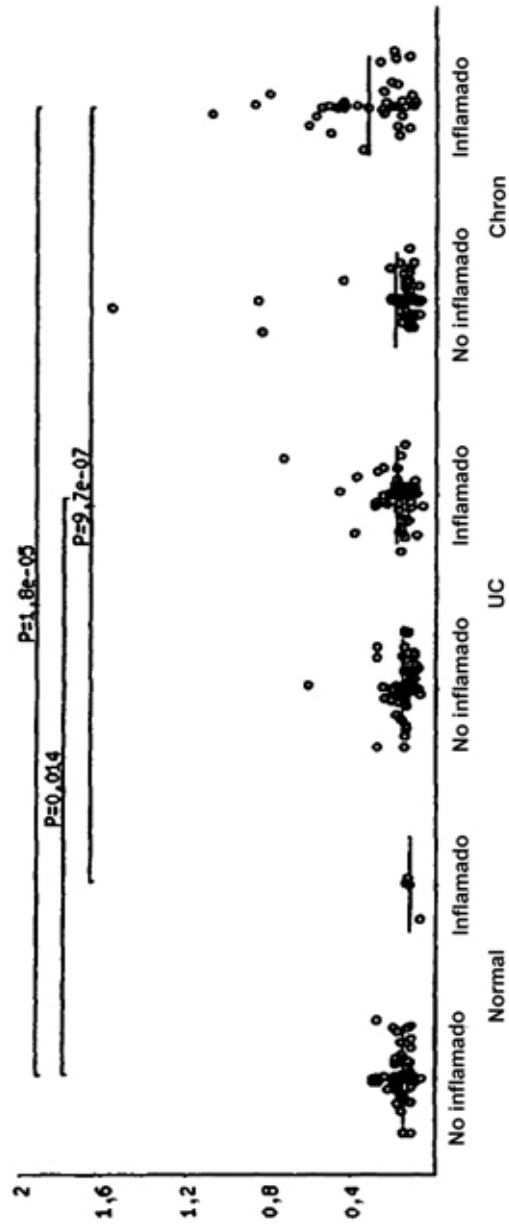


Figura 31A

# LYPD5

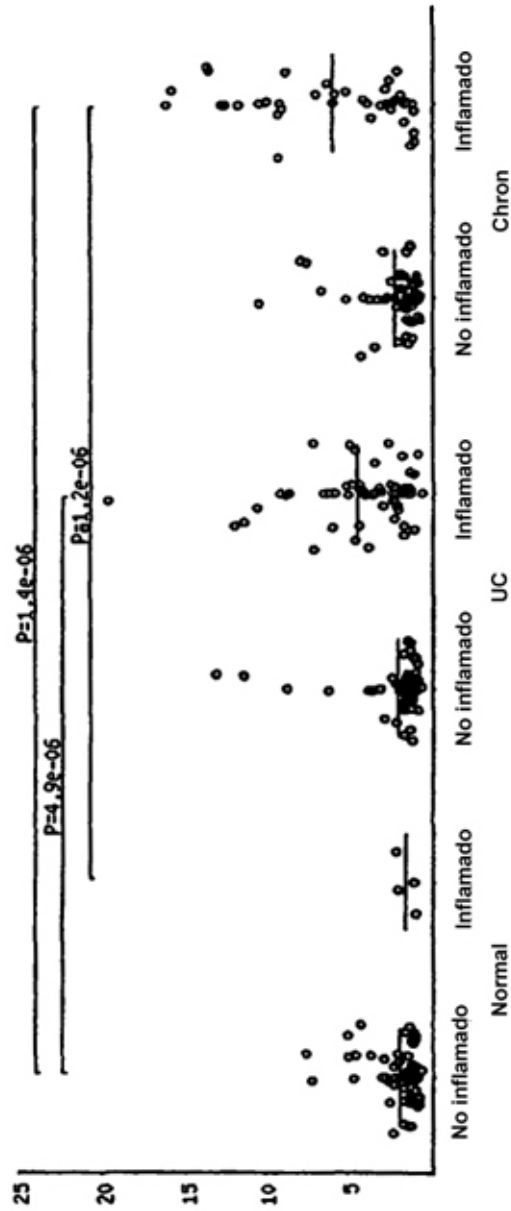


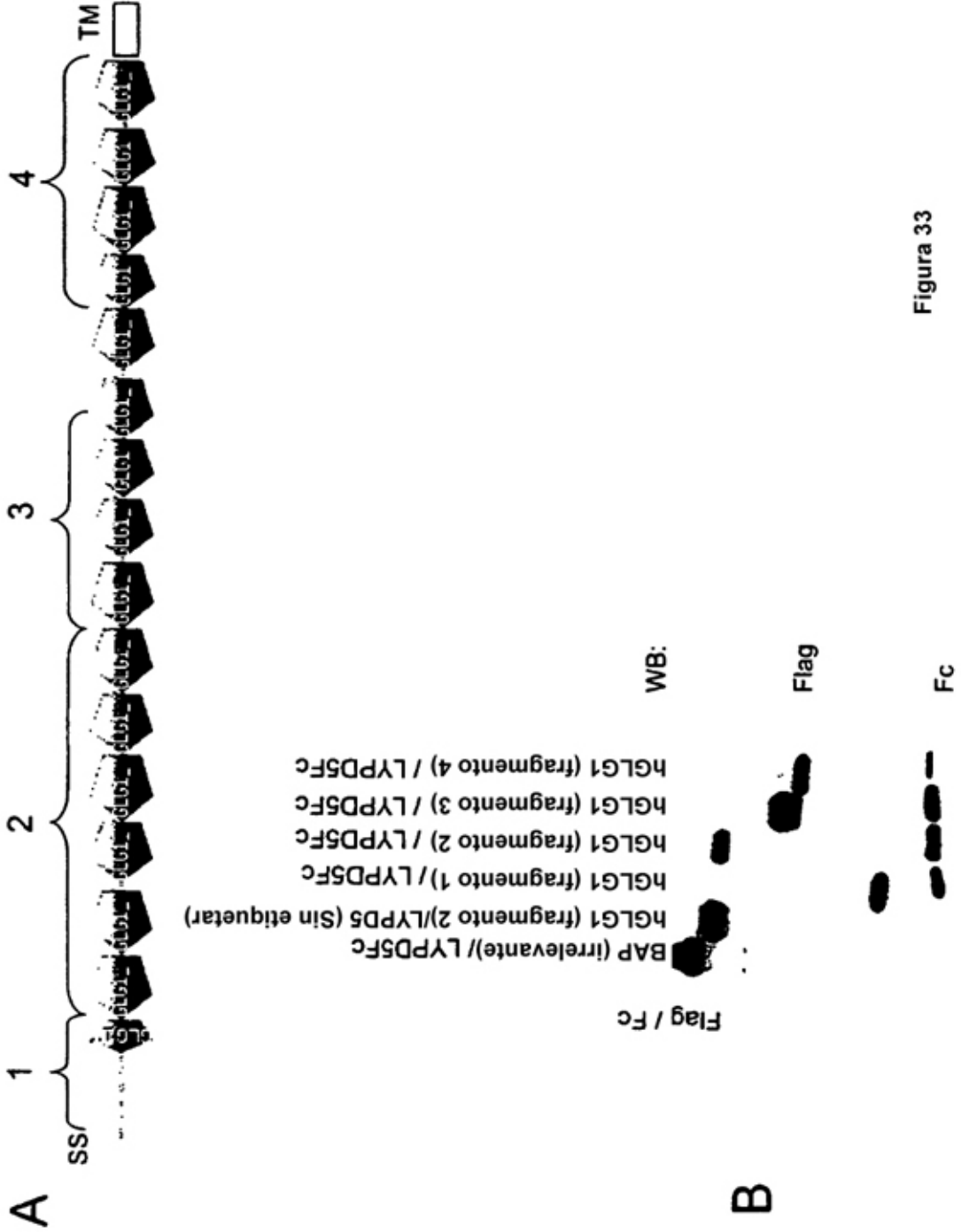
Figura 31B

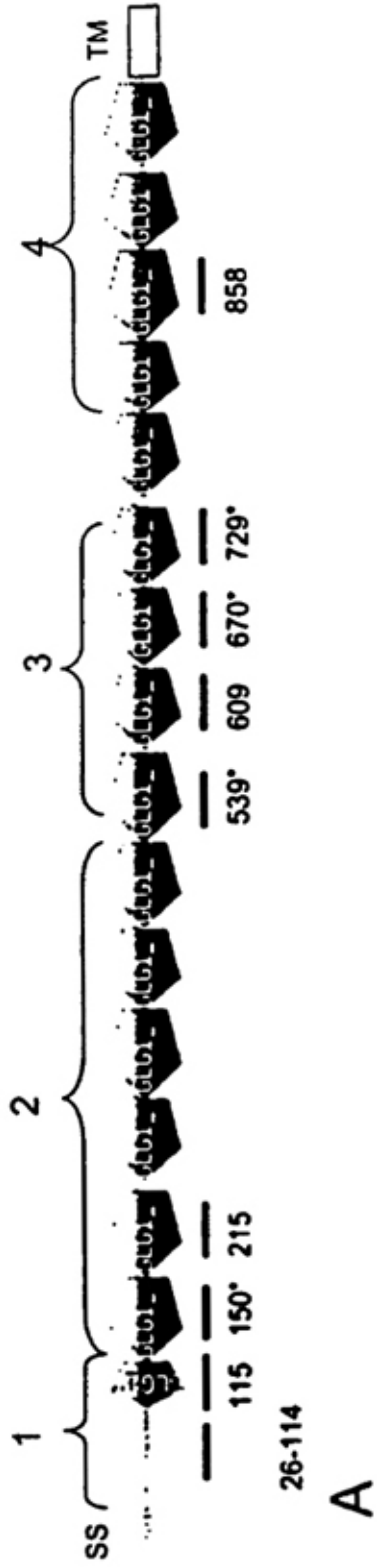


**Figura 32A**



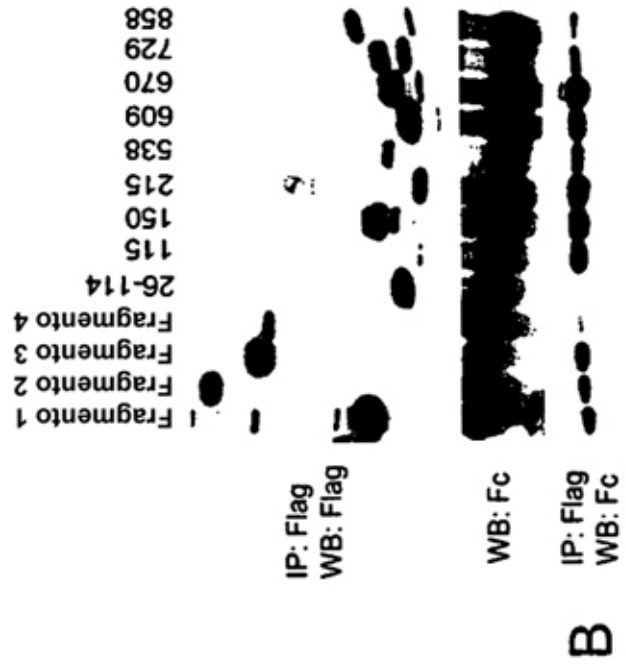
**Figura 32B**





26-114

A



B

Figura 34

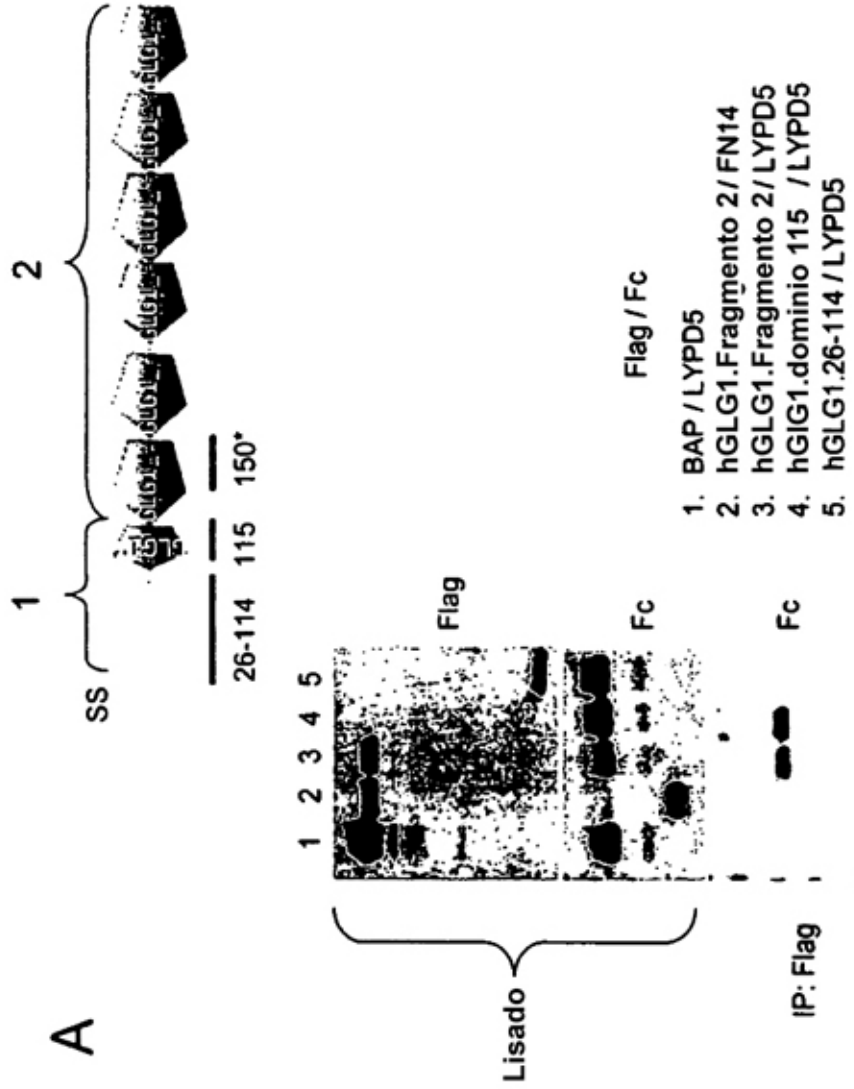


Figura 35



cgllgclgtc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagtctgact  
 lgccccacag ccagtgagtg actgcagcag caccagaatc lggctcgtt cctgltggc  
 lcttclacca ctacggcttg ggatctcggg catgggtgct ttgccaatgg tcttgtttt  
 gctgctggc ctgagcagag gtgagagtga atggacgcc aagatccat ccacagggga  
 tgccacagaa tggcggatc ctacctgtc catgctgggg tctgcccagc cagccccctc  
 ctgccagaag tgcattctc cacacccag ctgtcatgg tgcaagcaac tgaactcac  
 cgcctcggga gaggcggagg cgcggcgtc gcccgcagc gaggagctgc lggctcagg  
 ctgcccctc gaggagctgg aggagcccc gggccagcag gaggtctgc aggaccagc  
 yctcagccag ggcgcccgc gagaggggtc caccagctg gcgccagc ggttccgggt  
 cacgtcgcg cctggggagc cccagcagct ccaggtccgc ttcctcgtg ctgaggata  
 cccgttggac ctglactacc ttatggacct gagctactc atgaaggagc acctggaac  
 cgtgcccag ctgggacag ctctgctggc cggctcag gaagtcacc attctgtcg  
 caltggltt ggttctttg tggacaaaac ggtgctgcc ttgtgagca caglacctc  
 caactgcgc caccctgcc ccaccggct ggagcgtgc cagtcacat tcaacttca  
 ccatgtctg tccctgacgg gggacgcaca agccttcag cgggaggtgg ggcgccagag  
 lgttccggc aatctggact cgcctgaagg tggctcgtat gccattctc aggtgcact  
 ctgccaggag cagattggct ggagaaatgt gtcccggctg ctggttca ctccagcga  
 cacattcat acagctgggg acgggaagt gggcggcatt tcatgcca gtgatggga  
 ctgccattg gacagcaat gcctctacag tgcagcaca gatttgact accctctgt  
 ggtcagga gccagggcc tctctgagc aaatatccag cccatctt ctgtaccag  
 lgccgcactg cctgtctacc aggagctgag taaactgatt cctaagtctg cagttggga  
 gctgagtgag gactccagc acgtgtgaca gctcatcat gatgcttata atagcctgc  
 ttcaccgtg accctgaac actcttact cctcctggg gtccacatt ctacgaac  
 ccagtgtgag ggtctgaga agagggaggg laaggctgag gatcaggac agtgcaaca  
 cgtccgaac aaccagacgg tgaattctg ggttctct caagccacc actgcctcc  
 agycccat ctctgagge tccgggcc tggcttca gaggagctga ttgtggagt  
 gcacacgtg tgtactga attgcagtga caccagccc caggtccc actgcagtga  
 tggccagga cacctacaat gtggtgatg cagctgtgcc cctggccc taggtcggct  
 ctgtgctc tctgtgag agctgtct cccagacct gaaatgggt gccgggctcc  
 caatgycaca gggccccgt gcagtggaaa ggtcactgt caatgtggac gctgcagctg  
 cagtggacag agctcgggc atctgtgca gtgtgacgat gccagctgt agcgacatga  
 gggatctc tgcggaggct ttgctgctg ccaatgtgga gtatgact gctatgcaa  
 ccgcacggg agagcatgc aatgcagtgg ggacatggac agttgcatca gtcccaggg  
 agggctctg agtggcatg gacgctgca atgcaaccg tccagtgct tggacggta  
 ctatggct ctatgcgacc aatgccagg ctgcaagaca ccatgagaga gacaccggga  
 ctgtcagag tggggccct tccagactgg cccactggc accaactgca gtacagctg  
 tggccatacc aatgtgccc lggcctggc cctatctt gatgatggct ggtgcaaga  
 ggggacctg gacaaccagc lgttctt cttggtggag gatgacgca gaggcacggt  
 cgtctcaga gtgagcccc aagaaaagg agcagaccac acgaggcca ttgtctggg  
 ctgctaggg ggcactgtg cagtggggct ggggctgct ctggcttacc ggctcgggt  
 ggaatctat gaccgggg aatacagctg clttgagaag gacagcaac aactcaactg  
 gaagcaggac agtaatctc tctacaaaag tggcatcag accaccatca atctcgtt

Figura 36A

tcagaggca gacagtcca ctctgaag gagggagga cactlacca aggctctct  
cctggagga cagtgggaac tggagggtga gaggaagggt gggctgtaa gacctggta  
ggggactaat tcactggcga ggtgcggcca ccacctact tcaittcag agtgacacc  
aagagggtg ctcccatgc ctgcaacctt gcatcatct gggctacccc acccaagtat  
acaataaagt cttaccicag aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

Figura 36A (continuación)

MVALPMVLVLLLVLSRGESELDKIPSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHP  
SCAWCKQLNFTASGEAEARRCARREELLARGCPLEEEPRGQQEVLQDQPLSQGARG  
EGATQLAPQRVVRVTLRPGEPQQLQVRFLRAEGYPVDLYYLMDSLYSMKDDLVRQL  
GHALLVRLQEVTHSVRIGFGSFVDKTVLPFVSTVPSKLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSL  
TGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPGGFDAILQAALCQEQIGWRNVSRLLVFTSDDTFHT  
AGDGKLGGFMPDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPVSGQVAQALSAANIPIFAVTSAAAL  
PVYQELSKLIPKSAVGELSESSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLEHSSLPPGVHISYESQCEG  
PEKREGKAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLC  
DCNCSDTQPQAPHCSDBGHLQCGVCSCAPGRLGRLCECSVAELSSPDLESGCRAPNGT  
GPLCSGKGHCQCGRCSCSGQSSGHLCECDDASERHEGILCGGFGRQCQGVCHCHANR  
TGRACECSGDMDCISPEGGLCSGHGRCKCNRQCLDGYYGALCDQCPGCKTPCERHR  
DCAECGAFRTGPLATNCSTACAHTNVTALAPILDDGWCKERTLDNQLFFFLVEDDAR  
GTVVLRVRPQEKGADHTQAIVLGCVGGIVAVGLGLVLA YRLSVEIYDRREYSRFEKEQQ  
QLNWKQDSNPLYKSAITTTINPRFQEADSPTL

Figura 36B