



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 787**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97938165 .4**
96 Fecha de presentación : **14.08.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0920505**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.1999**

54 Título: **Antígenos de superficie celular de mamíferos; reactivos relacionados.**

30 Prioridad: **16.08.1996 US 689943**
07.10.1996 US 27901 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Schering Corporation**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72 Inventor/es: **Gorman, Daniel, M.;**
Randall, Troy, D. y
Zlotnik, Albert

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 787 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

Antígenos de superficie celular de mamíferos; reactivos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a moléculas que controlan la activación y expansión de células de mamíferos, especialmente células del sistema inmunitario de mamíferos. La invención proporciona genes, proteínas, anticuerpos, y reactivos relacionados útiles purificados, por ejemplo, para regular la activación, desarrollo, diferenciación, y función de diversos tipos de células, que incluyen células hematopoyéticas. En particular, la invención proporciona genes, productos de genes, composiciones 312C2 de mamíferos, y procedimientos para usarlos.

Antecedentes de la invención

La activación de células T en estado de reposo es crítica en la mayoría de las respuestas inmunitarias y permite que estas células ejerzan sus capacidades reguladoras o efectoras. Véase Paul (ed; 1993) *Fundamental Immunology* 3rd ed., Raven Press, N.Y. El aumento de adhesión entre células T y células que presentan antígeno (APC) u otras formas de estímulos primarios, por ejemplo, anticuerpos monoclonales inmovilizados (mAb), pueden potenciar las señales de receptor de células T. La activación de la célula T y la expansión de la célula T dependen del encajamiento del receptor de célula T (TCR) y las señales co-estimuladoras proporcionadas por las células accesorias. Véanse, por ejemplo, Jenkins and Johnson (1993) *Curr. Opin. Immunol.* 5:361-367; Bierer and Hahn (1993) *Semin. Immunol.* 5:249-261; June y col. (1990) *Immunol. Today* 11:211-216; y Jenkins (1994) *Immunity* 1:443-446. Una interacción coestimuladora principal, y bien estudiada, para células T implica indistintamente a CD28 o a CTLA-4 sobre células T con B7 o B70 indistintamente (Jenkins (1994) *Immunity* 1:443-446). Estudios recientes sobre ratones deficientes de CD28 (Shahinian, y col., (1993) *Science* 261:609-612; Green, y col. (1994) *Immunity* 1:501-508) y ratones transgénicos que expresan inmunoglobulina CTLA-4 (Ronchese y col. (1994) *J. Exp. Med.* 179:809-817) han revelado deficiencias en algunas respuestas de células T aunque esos ratones tengan respuestas inmunitarias primarias normales y respuestas CTL normales a virus de coriomeningitis linfocítica y virus de estomatitis vesicular. Como resultado, ambos estudios concluyen que otras moléculas coestimuladoras tienen que soportar la función de la célula T. Sin embargo, ha sido difícil la identificación de esas moléculas que intermedian distintas señales coestimuladoras.

La incapacidad para modular las señales de activación impide el control de respuestas inapropiadas fisiológicas o del desarrollo en el sistema inmunitario. La presente invención proporciona al menos una molécula coestimuladora alternativa, cuyos agonistas y antagonistas serán útiles en la modulación de una plétora de respuestas inmunitarias.

35 **Resumen de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una familia de proteínas que actúan como coestimuladoras de la activación de células T. En particular, la invención proporciona genes de mamíferos, por ejemplo ratón y ser humano, denominados m312C2 y h312C2, respectivamente, que se expresan en el timo y que se inducen sobre células T y células del bazo después de activación. El encajamiento de 312C2 estimula la proliferación de clones de células T, proliferación antígeno-específica y producción de citocina por células T, y parece que potencia expansión o apoptosis de células T. Las realizaciones de ratón y ser humano se describen con mayor detalle, pero la invención abarca genes, proteínas, anticuerpos de mamíferos y usos de los mismos. Equivalentes funcionales que exhiben homología de secuencia significativa están disponibles de otras especies de mamíferos y de no mamíferos. Además, el ligando de 312C2 puede funcionar como su compañero de unión para estimular otras células que expresan el antígeno.

La presente invención proporciona una proteína 312C2 sustancialmente pura o recombinante o fragmento de péptido de la misma. La proteína o polipéptido se expresa sobre células T activadas o se une específicamente a anticuerpos generados contra SEQ ID NO: 2 ó 4. Algunas realizaciones implican a una proteína o péptido que se selecciona entre una proteína o péptido de un animal de sangre caliente que se selecciona entre el grupo de aves y mamíferos, que incluye ratón; una proteína o péptido que comprende al menos un segmento de polipéptido de SEQ ID NO: 2 ó 4; una proteína o péptido que exhibe un patrón de modificación post-translacional distinto del 312C2 natural; o una proteína o péptido que es capaz de co-estimular una célula T. La proteína o péptido puede comprender una secuencia de la porción extracelular o intracelular de una 312C2; o ser una proteína de fusión.

La invención también proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70% sobre un tramo de al menos aproximadamente 30 nucleótidos con una secuencia de ácido nucleico 312C2 de SEQ ID NO: 1, 3 ó 5, útil, por ejemplo, como sonda o iniciador de PCR para un gen relacionado. Otra realización codifica además un polipéptido que comprende al menos aproximadamente 60% de identidad sobre un tramo de al menos aproximadamente 20 aminoácidos con una secuencia de 312C2 de SEQ ID NO: 2 ó 4.

Otra realización es una composición estéril que comprende una proteína 312C2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otras composiciones pueden combinar dichas entidades con un agonista o antagonista de otras moléculas que transducen señales de células T, por ejemplo, entidades que transducen señales a través de receptores de células T, CD40, ligando de CD40, CTLA-8, CD28, B7, B70, BAS-1, SLAM, etc.

La invención también engloba un anticuerpo, o fragmento del mismo que se une a antígeno, que se une específicamente a una proteína o péptido 312C2, y es específicamente inmunorreactivo con la proteína de SEQ ID NO: 4, por ejemplo, en el que la 312C2 es una proteína de mamífero, que incluye ratón; el anticuerpo se cultiva frente a una secuencia de péptido 312C2 purificado de SEQ ID NO: 2 ó 4; el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; o el anticuerpo está marcado. Los anticuerpos ponen a punto un procedimiento de purificar una proteína o un péptido 312C2 a partir de otros materiales en una mezcla, que comprende poner en contacto la mezcla con un anticuerpo anti-312C2, y separar materiales unidos a 312C2 de otros materiales.

Otro aspecto de la invención es un ácido nucleico aislado o recombinante capaz de codificar una proteína o un péptido 312C2, que incluye ácido nucleico que codifica una secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 4; que incluye una secuencia SEQ ID NO: 1, 3 ó 5; que codifica una secuencia de un dominio extracelular de 312C2 natural; o que codifica una secuencia de un dominio intracelular de 312C2 natural. Realizaciones de ácido nucleico de este tipo también incluyen un vector de expresión o de replicación.

También se proporciona un procedimiento para expresar un péptido 412C2 expresando un ácido nucleico que codifica un polipéptido 312C2. La invención también proporciona una célula, que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido 312C2.

La invención también proporciona un kit que contiene una 312C2 o fragmento sustancialmente puros; un anticuerpo o receptor que se une específicamente a 312C2; o un ácido nucleico, o su complemento, que codifica una 312C2 o péptido. Este kit también proporciona procedimientos para detectar en una muestra la presencia de un ácido nucleico, proteína, o anticuerpo, que comprende probar dicha muestra con un kit de este tipo.

La invención también suministra procedimientos para modular la fisiología de una célula *in vitro*, que comprenden poner en contacto dicha célula con una 312C2 o un fragmento de la misma sustancialmente puros; o con un anticuerpo o ligando que se une específicamente con 312C2; o con un ácido nucleico que codifica una 312C2 o un fragmento de péptido de la misma. Ciertas realizaciones preferidas incluyen un procedimiento en el que la célula es una célula T y la modulación de la fisiología es activación de la célula T o apoptosis de la célula T; o en el que la célula es un tejido.

La invención proporciona adicionalmente un uso de un anticuerpo o compañero de unión específico para 312C2; una proteína o polipéptido 312C2; o un ácido nucleico que codifica un péptido 312C2; la fabricación de un medicamento para tratamiento de proliferación celular anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas o trastornos autoinmunitarios en un mamífero. La respuesta inmunitaria anormal se caracteriza por una deficiencia inmunitaria de células T; inflamación crónica; o rechazo de tejido.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Las expresiones “ácido nucleico”, “sonda”, o “iniciador” incluyen referencia a un desoxirribonucleótido, ribonucleótido, o polímero mixto en forma de filamento indistintamente sencillo -o doble-, y salvo que se limite de otra manera, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de manera similar a la de nucleótidos que se producen naturalmente. Salvo que se indique otra cosa, una secuencia particular de ácido nucleico incluye la secuencia complementaria perfecta del mismo. Ácidos nucleicos eucarióticos son ácidos nucleicos de células eucariotas, preferiblemente células de eucariotas multicelulares.

Salvo que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi, respectivamente. Los intervalos numéricos son incluyentes de los números que definen el intervalo. Los términos que se definen a continuación se definen más completamente con referencia a la memoria de patente en su conjunto.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, incluye referencia a una célula, o ácido nucleico, o vector, que ha sido modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o la alteración de un ácido nucleico nativo hasta una forma no nativa para esa célula, o que la célula se deriva de una célula modificada de esa manera. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que están por lo demás anormalmente expresados, subexpresados o no expresados en absoluto.

El término “subsecuencia” en el contexto de una secuencia referenciada de ácido nucleico incluye referencia a una secuencia contigua del ácido nucleico que tiene unos pocos menos nucleótidos de longitud que el ácido nucleico referenciado. En el contexto de una secuencia referenciada de proteína, polipéptido, o péptido (colectivamente, “proteína”), “subsecuencia” se refiere a una secuencia contigua de la proteína referenciada que tiene unos pocos menos aminoácidos que la proteína referenciada.

En este documento se puede hacer referencia a aminoácidos tanto por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos como por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica de IUPAC-IUB. De modo similar, se puede hacer referencia a nucleótidos por sus códigos de letra única comúnmente aceptados.

ES 2 308 787 T3

“Variantes modificadas de modo conservador” aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias particulares de ácidos nucleicos, variantes modificadas de modo conservador se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifica cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Así, en cada posición en la que una alanina está especificada mediante un codón, el codón puede ser alterado a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Variaciones de ácidos nucleicos de este tipo son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de modo conservador. En este documento cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es comúnmente el único codón para metionina) puede ser modificado para dar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita. Se pretende hacer sustituciones con nucleótidos o análogos inusuales funcionalmente equivalentes, por ejemplo, inositol, etc.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altere, añada o suprima un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de modo conservador” cuando la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Tablas de sustituciones de modo conservador que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido Glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Véase también, Creighton (1984) *Proteins* W. H. Freeman and Company.

Por “aminoácidos contiguos de” en el contexto de un cierto número especificado de restos de aminoácidos de una secuencia especificada, se quiere dar a entender una secuencia de aminoácidos del cierto número especificado de dentro de la secuencia de referencia especificada que tiene idéntico orden de aminoácidos cada uno de los cuales es directamente adyacente a los mismos aminoácidos que en la secuencia de referencia.

El término “polipéptido” según se usa en este documento incluye un fragmento o segmento significativo, y abarca un tramo de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos aproximadamente 12 aminoácidos, típicamente al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, y, en realizaciones particularmente preferidas al menos aproximadamente 30 aminoácidos o más.

La expresión “pluralidad de fragmentos que no se solapan” abarca una serie de fragmentos o segmentos de polipéptido. Una pluralidad incluye 2, 3, 4, 5, etc., fragmentos de polipéptido.

Las expresiones “biológicamente puro” y “aislado” se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente exento de componentes que normalmente acompañan o interactúan con él según se encuentra en su medio en que se produce naturalmente. El material aislado opcionalmente comprende material que no se encuentra con el material en su medio natural.

La frase “codifica una proteína” en el contexto de ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos que codifican proteínas que se producen naturalmente o derivados de proteínas naturales, pero que están modificados deliberadamente o sometidos a técnicas de ingeniería para que ya no se hibriden con un gen natural que codifica la proteína de origen natural bajo las condiciones expuestas.

Una “ventana de comparación”, según se usa en este documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera del cierto número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, habitualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que dos secuencias estén alineadas óptimamente. Procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede

conducir mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; mediante el algoritmo de homología de alineación de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-445; mediante el procedimiento de búsqueda de similaridad de Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:2444; mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (que incluyen, pero no se limitan a CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, EE.UU.); el programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins and Sharp (1988) *Gene* 73:237-244 y Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet y col. (1988) *Nucleic Acids Research* 16:10881-90; Huang, y col., (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65, y Pearson y col. (1994) *Methods in Molecular Biology* 24:307-31. La alineación también se realiza a menudo mediante inspección y alineación manual.

Las expresiones “idéntico” o “identidad de secuencia” en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia con referencia a proteínas se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas difieren a menudo en sustituciones conservadoras de aminoácidos, cuando se sustituyen restos aminoácido con otros restos aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar al alza para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente esto implica puntuar una sustitución conservadora como una discrepancia parcial en lugar de total, aumentando con ello el porcentaje de identidad de secuencia. Así, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, según el algoritmo de Meyers and Miller (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4:11-17, por ejemplo, según se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, EE.UU.).

Las expresiones “identidad sustancial” o “similaridad” de secuencias de polinucleótido quieren dar a entender que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos identidad de secuencia de 60%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%, comparada con una secuencia de referencia usando, por ejemplo los programa anteriormente descritos (preferiblemente BLAST) usando parámetros estándar. Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que el polipéptido que codifica el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo al cruce con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico tienen sustancialmente igual identidad es que las dos moléculas se hibriden entre sí bajo “condiciones de hibridación de rigurosidad moderada” (o “condiciones moderadas”). “Condiciones de hibridación de rigurosidad moderada” ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos comunes en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden usar condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de similar rigurosidad. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones de hibridación de rigurosidad moderada todavía son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que ellos codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico, por ejemplo, usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Las expresiones “identidad sustancial” y “similaridad” en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos identidad de secuencia de 60% con una secuencia de referencia, habitualmente al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 85%, lo más preferiblemente al menos 90% o 95% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia sobre una ventana de comparación especificada. Preferiblemente, la alineación óptima se conduce usando el algoritmo de homología de alineación de Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443. Una indicación de que dos secuencias de péptido son sustancialmente idénticas es que un péptido sea inmunológicamente reactivo con anticuerpos desarrollados contra el segundo péptido. Así, un péptido es idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente en alguna sustitución conservadora. Generalmente, se determina la similaridad usando una ventana de comparación que tiene una longitud de un número cualquiera desde 20 posiciones contiguas hasta el número de restos en la longitud total de la secuencia de la región del núcleo, cuando la ventana de comparación está dentro de la secuencia del núcleo.

Las expresiones sondas de “oligonucleótido” y “polinucleótido” incluyen referencia a ADN o ARN tanto de filamento doble como de filamento sencillo. Las expresiones también se refieren a secuencias derivadas de modo sintético o de modo recombinante esencialmente exentas de contaminación de ácido no nucleico.

Según se usan en este documento “contacto” o “poner en contacto” quieren dar a entender colocar en asociación física directa, por ejemplo mezclando soluciones.

“Muestra biológica” según se usa en este documento es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene una proteína 312C2, u otra composición descrita, por ejemplo ácido nucleico o proteína. Muestras de este tipo incluye, pero no se limitan, esputo, fluido amniótico, sangre, células sanguíneas, por ejemplo glóbulos blancos, o tejido, por ejemplo, bazo, timo, médula ósea, nódulo linfático. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Ejemplos de muestras biológicas incluyen

ES 2 308 787 T3

una muestra celular de tejido nervioso, muscular, glandular o epitelial o del sistema inmunitario (por ejemplo, células T). Se obtiene típicamente una muestra biológica de un organismo eucariota, preferiblemente eucariotas multicelulares tales como insecto, protozoo, aves, peces, reptiles y preferiblemente un mamífero tal como rata, ratones, vaca, perro, cobaya, cerdo, cabra, o conejo, y lo más preferiblemente un primate, tal como macaco, chimpancé o seres humanos.

Un “vector de expresión” es un constructo de ácido nucleico, típicamente generado de modo sintético o de modo recombinante, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se ha de transcribir, y un promotor.

La frase “efectos funcionales” en el contexto de los ensayos para probar compuestos que afectan a 312C2 incluye la determinación de cualquier parámetro que esté indirectamente o directamente bajo la influencia de 312C2. Esto incluye cambios tales como aumentos o disminuciones de transcripción o liberación de segundo mensajero o linfocina.

Por “que hibrida selectivamente” o “hibridación selectiva” o “hibrida selectivamente” se quiere dar a entender hibridación, bajo condiciones de hibridación rigurosas, de una secuencia de ácido nucleico a una secuencia diana de ácido nucleico especificada hasta un grado detectablemente mayor que su hibridación hasta secuencias no diana de ácido nucleico y/o hasta exclusión sustancial de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias que hibridan selectivamente tienen típicamente al menos identidad de secuencia de 80%, habitualmente identidad de secuencia de 90%, preferiblemente identidad de 95%, más preferiblemente identidad de 98%, y lo más preferiblemente identidad de secuencia de 100% (es decir, complementaria) entre sí. El “porcentaje de identidad de secuencia” se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, en la que la porción de secuencia de nucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en que ocurre idéntica base de ácido nucleico o resto aminoácido en ambas secuencias para dar el número de posiciones igualadas, dividiendo el número de posiciones igualadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las expresiones “condiciones rigurosas” o “condiciones rigurosas de hibridación” se refieren a condiciones bajo las que una sonda se hibridará a su secuencia diana, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana complementaria hibrida a una sonda perfectamente igualada. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración de sal es menos de aproximadamente 1,0 M de ión Na, típicamente concentración de ión Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo mayores de 50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación con una solución tampón de formamida al 30%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 2X SSC a 50°C. Ejemplarmente condiciones de alta rigurosidad incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1X SSC a 60°C.

“Condiciones rigurosas de hibridación” o “condiciones rigurosas” en el contexto de formatos de ensayos de hibridación de ácido nucleico dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros del medio. Una extensa guía para la hibridación de ácido nucleico se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Acid Probes* Part I, Chapter 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, Nueva York. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas.

Por “complejo de hibridación” se quiere dar a entender una secuencia de ácido nucleico dúplex formada mediante hibridación selectiva entre sí de dos secuencias de ácido nucleico de filamento sencillo.

Por “célula huésped” se quiere dar a entender una célula que se manipula para que contenga, y en ciertas circunstancias, exprese una molécula, habitualmente un ácido nucleico. Las células huésped pueden ser células procariontas tales como *E. Coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio o mamífero.

El término “anticuerpo” también incluye formas de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab)₂) que se unen a antígeno. El término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo que se unen específicamente y reconocen un analito (antígeno). Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un miembro de fragmentos bien caracterizados que se producen mediante digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo bajo los acoplamientos disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera que se junta a V_H-C_H1 mediante un enlace disulfuro. El Fab(ab)₂ se puede reducir bajo condiciones suaves para romper el acoplamiento disulfuro en la región bisagra, convirtiendo con ello el dímero F(ab)₂ en un monómero

ES 2 308 787 T3

Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra, véase, por ejemplo, Paul (ed.) (1993) *Fundamental Immunology*, 3rd ed., Raven Press, N.Y. Aun cuando diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que fragmentos de este tipo se pueden sintetizar ex novo tanto químicamente como utilizando metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, según se usa en este documento, es funcionalmente equivalente a fragmentos de anticuerpo tales como Fv de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos (es decir, que comprenden regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, que comprenden una región que determina complementariedad (CDR) de una fuente no humana) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

Por "condiciones inmunológicamente reactivas" se quiere dar a entender condiciones que permiten a un anticuerpo, generado para un epítipo particular, que se una a ese epítipo en un grado detectablemente mayor del que se une el anticuerpo a sustancialmente todos los otros epítipos. Las condiciones inmunológicamente reactivas dependen del formato de la reacción de unión del anticuerpo y típicamente son las que se utilizan en los protocolos de inmunoensayo. Véase Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo.

Por "anticuerpo reactivo a una proteína" se quiere dar a entender que la "proteína es específicamente inmunorreactiva con un anticuerpo".

La frase "específicamente inmunorreactivo con un anticuerpo" o "se une específicamente con un anticuerpo" cuando se refiere a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión entre un anticuerpo y una proteína que tiene un epítipo reconocido por el sitio del anticuerpo en que se une al antígeno. Esta reacción de unión es determinante de la presencia de una proteína que tiene el epítipo reconocido entre la presencia de una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. Así, bajo condiciones de inmunoensayo definidas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína que tiene el epítipo reconocido y se unen, si es el caso, en un grado detectablemente más bajo a otras proteínas que carecen del epítipo que están presentes en la muestra.

La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que sea seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, se puede hacer una selección entre anticuerpos desarrollados frente a la 312C2 de SEQ ID NO: 2 ó 4 para obtener anticuerpos específicamente inmunorreactivos con esa proteína particular y no con otras proteínas. Las proteínas usadas como inmunógenos pueden estar en conformación nativa o desnaturalizadas, por ejemplo, de modo que proporcionen un epítipo lineal.

Se puede usar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden usar para determinar inmunorreactividad específica.

Por "antígeno" se quiere dar a entender una sustancia frente a la que se puede generar un anticuerpo y con la que el anticuerpo es específicamente inmunorreactivo. Un anticuerpo inmunológicamente reactivo con un antígeno particular puede ser generado *in vivo* o mediante procedimientos recombinantes tales como selección de bancos de anticuerpos recombinantes en vectores fago o similares. Véanse, por ejemplo, Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; y Ward, y col. (1989) *Nature* 341:544-546; y Vaughan y col. (1996) *Nature Biotechnology*, 14:309-314.

Por "transfectado" se quiere dar a entender la introducción de un ácido nucleico en una célula eucariota donde el ácido nucleico puede ser incorporado al genoma de la célula (es decir, cromosoma, plásmido, o ADN mitocondrial), puede ser convertido en un replicón autónomo o puede ser expresado transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado). La transfección puede ser *in vivo* o *ex vivo*. "Ex vivo" quiere dar a entender fuera del cuerpo del organismo del que se obtiene la célula o células o del que se aísla la línea celular. La transfección *ex vivo* preferiblemente se continúa con re-infusión de las células que son devueltas al organismo. En contraposición, por "*in vivo*" se quiere dar a entender dentro del cuerpo del organismo del que se obtuvo la célula o del que se aísla la línea celular.

La expresión "composición de unión" se refiere a moléculas que se unen con especificidad a 312C2, por ejemplo en una manera del tipo de emparejamiento por adhesión celular, o una interacción anticuerpo-antígeno. También incluye compuestos, por ejemplo, proteínas que se asocian específicamente con 312C2, incluso en una interacción proteína-proteína natural fisiológicamente relevante, tanto covalente como no covalente. La molécula puede ser un polímero, o un reactivo químico. Un análogo funcional puede ser un antígeno con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula que tiene una forma molecular que interacciona con los apropiados determinantes de unión. Los compuestos pueden servir como agonistas o antagonistas de la interacción de unión, véase por ejemplo, Goodman, y col. (eds.) (1990) *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8th ed.), Pergamon Press.

Sustancialmente pura típicamente quiere dar a entender que la proteína está exenta de otras proteínas, ácidos nucleicos u otras sustancias biológicas contaminantes con las que se asocia en el organismo fuente original. La pureza se puede ensayar mediante procedimientos estándar, típicamente ponderales, y será comúnmente al menos 40% pura, generalmente al menos 50% pura, a menudo al menos aproximadamente 60% pura, típicamente al menos aproximadamente 80% pura, preferiblemente al menos aproximadamente 90% pura, y en las realizaciones más preferidas al menos aproximadamente 95% pura. A menudo se añadirán vehículos y excipientes.

II. General

La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN que codifican diversas proteínas de mamíferos que son antígenos encontrados en las etapas tempranas de activación de células T, por ejemplo, que pueden activar una célula T. Entre estas proteínas están antígenos que modulan, por ejemplo, inducen o previenen proliferación o diferenciación de células T, entre otros efectos fisiológicos. Los antígenos de longitud completa y los fragmentos, o antagonistas serán útiles en modulación fisiológica de células que expresan el antígeno. Las proteínas también serán útiles como antígenos, por ejemplo, inmunógenos, para desarrollar anticuerpos para diversos epítopos sobre la proteína, ambos epítopos lineales y conformacionales. La molécula puede ser útil para definir subconjuntos de células T o células NK funcionales.

Se aisló un ADNc que codificaba 312C2 de ratón a partir de un banco de ADNc de células pro-T activadas, véase Kelner, y col. (1994) *Science* 266:1395-1399. El ADNc de 312C2 de ratón contiene un tramo de aproximadamente 1073 pb de longitud y contiene un gran marco de lectura abierta que codifica una proteína transmembrana de Tipo I. Perfiles estructurales incluyen una secuencia líder N-terminal de aproximadamente 19 aminoácidos, una región extracelular de aproximadamente 153 aminoácidos, una porción de expansión de membrana presuntamente hidrófoba de aproximadamente 25 aminoácidos, y un presunto dominio citoplásmico de aproximadamente 50 aminoácidos. Véase SEQ ID NO: 2. Se aisló ADNc humano usando clon de ratón para sondar un banco de células T anérgicas humanas denominado HY06. Véase SEQ ID NO: 3 y 4. Una región de transmembrana puede comenzar aproximadamente en el aminoácido 155 y terminar aproximadamente en el aminoácido 185.

312C2 exhibe motivos estructurales característicos de un miembro de la familia de los receptores del TNF, con numerosas repeticiones de cisteína. Compárese, por ejemplo, con CD40, OX40, receptor del TNF, receptor del NGF, y receptor del FASL.

Según se usa en este documento, la expresión "312C2 de ratón" abarcará, cuando se use en un contexto de proteína, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2, o un fragmento significativo de tal proteína, u otra proteína altamente homóloga derivada de ratón. La expresión "312C2 humana" abarcará, cuando se use en un contexto de proteína, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4, o un fragmento significativo de tal proteína, u otra proteína altamente homóloga derivada de ser humano.

Los antígenos naturales son capaces de intermediar diversas respuestas bioquímicas que conducen a respuestas biológicas o fisiológicas en células diana. Las realizaciones caracterizadas en este documento son de ratón y de ser humano, pero existen otras especies y variantes de tejidos específicas. Secuencias adicionales para proteínas en otras especies de mamíferos, por ejemplo, primates y roedores, también deberían estar disponibles. Véase a continuación. Las descripciones a continuación se dirigen, con fines ejemplares, a 312C2 de ratón o humana, pero son aplicables de modo similar a realizaciones que se refieran a otras especies.

III. 312C2 purificada

La secuencia de ácido nucleico de 312C2 de ratón se muestra en SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de 312C2 de ratón se muestra en SEQ ID NO: 2, la secuencia de ácido nucleico de 312C2 humana se muestra en SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de 312C2 humana se muestra en SEQ ID NO: 2, y una translación inversa de la secuencia de 312C2 se muestra en SEQ ID NO: 5, (5'ATG no se representa en SEQ ID NO: 5). Estas secuencias de aminoácidos, proporcionadas amino a carboxi, son importantes para proporcionar información de secuencia respecto al antígeno que permite distinguir la proteína de otras proteínas y que ejemplifica numerosas variantes. Asimismo, la secuencia de péptidos permite preparación de péptidos para generar anticuerpos para reconocer segmentos de este tipo, y las secuencias de nucleótidos permiten preparación de sondas de oligonucleótidos, todas las cuales son estrategias para detección o aislamiento, por ejemplo, clonación, de genes que codifican tales secuencias.

El nucleótido 312C2 de ratón y la secuencia de aminoácidos prevista, particularmente la secuencia líder prevista y la secuencia transmembrana discurren desde aproximadamente Met1 a Gly19, aunque las fronteras naturales pueden ser diferentes, también dependiendo del tipo de célula. En la posición de nucleótido 1010 se produce una señal de poliadenilación. La cola poli A comienza en la posición 1034. Véanse SEQ ID NO: 1 y 4.

Los anticuerpos para estas proteínas se unen típicamente a una 312C2 con alta afinidad, por ejemplo, al menos aproximadamente 100 nM, habitualmente mejor que aproximadamente 30 nM, preferiblemente mejor que aproximadamente 10 nM, y más preferiblemente mejor que aproximadamente 3 nM. Proteínas homólogas se encontrarían en especies de mamíferos distintas del ratón, por ejemplo primates y roedores. Especies de no mamíferos también deberían poseer genes y proteínas relacionados estructuralmente o funcionalmente, por ejemplo, aves o anfibios.

La solubilidad de un polipéptido o fragmento depende del medio y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido, incluyendo temperatura, medio electrolítico, tamaño y características moleculares del polipéptido, y naturaleza del solvente. Típicamente, la temperatura a la que se usa el polipéptido oscila de aproximadamente 4°C a aproximadamente 65°C. Habitualmente la temperatura de uso es mayor de aproximadamente 18°C. Para fines de diagnóstico, la temperatura será habitualmente la temperatura ambiente, o más cálida, pero menor que la temperatura de desnaturalización de los componentes en el ensayo. Para fines terapéuticos la temperatura será la tem-

peratura corporal, típicamente aproximadamente 37°C para seres humanos y ratones, aunque bajo ciertas situaciones la temperatura se puede subir o bajar *in situ* o *in vitro*.

5 El tamaño y estructura del polipéptido deberían estar generalmente en estado sustancialmente estable, y habitualmente no en estado desnaturalizado. El polipéptido puede asociarse con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, por ejemplo, para conferir solubilidad, o asociarse con lípidos o detergentes de una manera que se aproxime a las interacciones bicapa de lípidos naturales.

10 El solvente y los electrolitos serán habitualmente un tampón biológicamente compatible, de un tipo que se use para conservación de actividades biológicas, y se aproximarán habitualmente a un solvente acuoso fisiológico. Habitualmente, el solvente tendrá un pH neutro, típicamente entre aproximadamente 5 y 10, y preferiblemente aproximadamente 7,5. En algunas ocasiones, se añadirán uno o más detergentes, típicamente uno suave no desnaturalizante, por ejemplo, CHS (hemisuccinato de colesterilo) o CHAPS (3-[3-colamidopropil]dimetilamonio]-1-propano sulfonato), o una concentración suficientemente baja para que evite una disrupción significativa de las propiedades estructurales o
15 fisiológicas de la proteína.

A. Variantes físicas

20 Esta invención también abarca proteínas o péptidos que tienen sustancial identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de 312C2. Las variantes incluyen variantes de especies, polimórficas o alélicas.

La homología de secuencia de aminoácidos, o identidad de secuencia, se determina optimizando igualdades de restos, si es necesario, introduciendo los huecos que se requieran. Véanse también Needleham, y col. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff, y col. (1983) Chapter One in *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Wesley, Reading, MA; y paquetes de programas informáticos de
25 *Intelligentics*, Mountain View, CA; y de University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI. La identidad de secuencia cambia cuando las sustituciones conservadoras se consideran como igualdades. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Secuencias de aminoácidos homólogas tienen típicamente la intención de incluir variaciones polimórficas o alélicas naturales e interespecies en cada respectiva secuencia de proteína. Proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán identidad de 25-100% (si se pueden introducir huecos), a identidad de 50-100% (si se incluyen sustituciones conservadoras) con la secuencia de aminoácidos de 312C2. Las medidas de identidad serán al menos aproximadamente 35%, generalmente al menos aproximadamente 40%, a menudo al menos aproximadamente 50%, típicamente al menos aproximadamente 60%, habitualmente al menos aproximadamente 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 90%.
35

El ADN de 312C2 aislado se puede modificar fácilmente mediante sustituciones de nucleótido, supresiones de nucleótido, inserciones de nucleótido, e inversiones de tramos de nucleótido. Estas modificaciones dan como resultado una nueva secuencia de ADN que codifica aquellos antígenos, sus derivados o proteínas que tienen similar actividad funcional fisiológica, inmunogénica, antigénica u otras. Esas secuencias modificadas se pueden usar para producir antígenos mutantes o para mejorar la expresión. La expresión mejorada puede implicar amplificación de gen, aumento de transcripción, aumento de translación, y otros mecanismos. "312C2 mutante" abarca un polipéptido que cae por lo demás dentro de la definición de identidad de secuencia de la 312C2 que se ha expuesto anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la de 312C2 según se encuentra normalmente en la naturaleza, sea por vía de supresión, sustitución, o inserción. Generalmente incluye proteínas que tienen identidad significativa con una proteína que tiene secuencia de SEQ ID NO: 2, y comparte diversas actividades biológicas, por ejemplo, antigénicas o inmunogénicas, con aquellas secuencias, y en realizaciones preferidas contiene la mayoría de las secuencias de longitud completa descritas. Se preferirán típicamente las secuencias de longitud completa, aunque también serán
45 útiles versiones truncadas, de modo similar, genes o proteínas encontrados de fuentes naturales son típicamente los más deseados. Conceptos similares aplican a diferentes proteínas 312C2, particularmente aquellas que se encuentran en diversos animales de sangre caliente, por ejemplo, mamíferos y aves. Estas descripciones generalmente quieren dar a entender que abarcan todas las proteínas 312C2, no limitadas a las realizaciones particulares de ratón específicamente descritas.
55

También se puede conducir mutagénesis de 312C2 haciendo inserciones o supresiones de aminoácidos. Se pueden generar sustituciones, supresiones o inserciones, o cualesquiera combinaciones para llegar a un constructo final. Las inserciones incluyen fusiones amino- o carboxi- terminales. Se puede conducir mutagénesis aleatoria en un codón diana y los mutantes expresados pueden ser examinados a continuación respecto a la actividad deseada. Procedimientos para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante técnicas de mutagénesis de iniciador de M13 o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véanse, por ejemplo, Sambrook, y col. (1989); Ausubel, y col. (1987 y suplementos); y Kunbel, y col. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382.
60

65 La presente invención también proporciona proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heteróloga que usan segmentos de esas proteínas. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos que naturalmente no se fusionan normalmente de la misma manera. Un concepto similar aplica a secuencias heterólogas de ácido nucleico.

Además, se pueden hacer nuevos constructos combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, segmentos de unión a diana u otros pueden ser “intercambiados” entre diferentes polipéptidos o fragmentos de nueva fusión. Véanse, por ejemplo, Cunningham, y col. (1989) *Science* 243:1330-1336; y O’Dowd, y col. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992.

El procedimiento de la fosforamidita descrito por Beaucage and Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos sintéticos de ADN adecuados. Un fragmento de doble filamento se obtendrá a menudo o bien sintetizando el filamento complementario e hibridando el filamento conjuntamente en condiciones apropiadas o bien añadiendo el filamento complementario usando ADN polimerasa con una secuencia de iniciador apropiada, por ejemplo, técnicas PCR.

B. Variantes funcionales

El bloqueo de la respuesta fisiológica a 312C2s se puede originar de la inhibición de la unión del antígeno a su compañero de unión, por ejemplo, otro de sí mismo, probablemente a través de inhibición competitiva. Así ensayos *in vitro* de la presente invención a menudo usarán proteína aislada, membranas de células que expresan una 312C2 recombinante asociada de membrana, fragmentos solubles que comprenden segmentos de esas proteínas que se unen a antígeno, o fragmentos fijados a sustratos en fase sólida. Estos ensayos también permitirán la determinación del diagnóstico de los efectos tanto de mutaciones y modificaciones de segmentos de unión, como de mutaciones y modificaciones de antígenos, por ejemplo, análogos de 312C2.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de examen de fármacos competitivos, por ejemplo, los que neutralizan anticuerpos con antígeno o fragmentos de unión compiten con un compuesto de prueba para unirse a la proteína, por ejemplo de una secuencia de proteína natural.

“Derivados” de antígenos de 312C2 incluyen mutantes de secuencia de aminoácidos de formas que se producen naturalmente, variantes de glicosilación, y conjugados covalentes o agregados con otros restos químicos. Se pueden preparar derivados covalentes mediante vinculación de funcionalidades a grupos que se encuentran en cadenas laterales de aminoácidos de 312C2 o en los terminales -N o -C, por ejemplo, por medios estándar. Véanse, por ejemplo, Lundblad and Noyes (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification*, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (ed.) (1989) *Techniques in Protein Chemistry*, Academic Press, San Diego, CA; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, FL.

En particular, se incluyen alteraciones de glicosilación, por ejemplo, las que se hacen modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesado, o en etapas adicionales. Véase, por ejemplo, Elbein (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:497-534. También se engloban versiones de los péptidos con la misma secuencia primaria de aminoácidos que tienen otras modificaciones menores, que incluyen restos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre 312C2 y otras proteínas homólogas o heterólogas. Muchos receptores de citocina u otras proteínas de superficie son multiméricos, por ejemplo, entidades homodiméricas, y un constructo de repetición pueden tener diversas ventajas, que incluyen susceptibilidad reducida al troceado proteolítico. Ejemplos típicos son las fusiones de un polipéptido reportero, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de una proteína, por ejemplo, segmento de unión-receptor, de modo que la presencia o situación de un ligando fusionado puede ser fácilmente determinada. Véase, por ejemplo, Dull, y col. patente de EE.UU. N° 4.859.609. Otros compañeros de fusión de gen incluyen β -galactosidasa bacteriana, trpE, Proteína A, β -lactamasa, alfa amilasa, alcohol deshidrogenasa, factor de apareamiento de levadura alfa, y etiquetas de detección o purificación tales como una secuencia FLAG de secuencia His6. Véase por ejemplo, Godowski, y col. (1988) *Science* 241:812-816.

Péptidos de fusión se van a hacer típicamente tanto mediante procedimientos de ácido nucleico recombinante como mediante procedimientos de polipéptido sintético. Técnicas para manipulación y expresión de ácido nucleico se describen generalmente, por ejemplo, en Sambrook, y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; y Ausubel, y col. (eds.) (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, NY. Se describen técnicas para síntesis de polipéptidos, por ejemplo, en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232:341-347; Atherton, y col. (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Grant (1992) *Synthetic Peptides: A User’s Guide*, W. H. Freeman, NY.

Esta invención también contempla el uso de derivados de 312C2s distintos de variaciones en secuencia de aminoácidos o glicosilación. Derivados de este tipo pueden suponer asociación covalente o agregativa con restos químicos. Los derivados covalentes o agregativos serán útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos, o en procedimientos de purificación tales como purificación por afinidad de compañeros de unión, por ejemplo, otros antígenos. Una 312C2 puede ser inmovilizada mediante enlace covalente con un soporte sólido tal como SEPHAROSE activada con bromuro de cianógeno, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, o adsorbida sobre superficies de poliolefina, con o sin reticulación de glutaraldehído, para uso en el ensayo o purificación de anticuerpos anti-312C2 o una composición de unión alternativa. Las 312C2 también pueden ser marcadas con un grupo detectable, por ejemplo para usos en ensayos de diagnóstico. La purificación de 312C2 se puede efectuar mediante un anticuerpo inmovilizado o un compañero de unión complementario.

Una 312C2 solubilizada o fragmento de esta invención se puede usar como inmunogen para la producción de antisueros o anticuerpos específicos para unión al antígeno o fragmentos del mismo. Se puede usar antígeno purificado para examinar anticuerpos monoclonales o fragmentos que se unen a antígeno, que abarcan fragmentos que se unen a antígeno de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)₂, etc. Las 312C2 purificadas también se pueden usar como reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados del antígeno o fragmentos celulares que contienen el antígeno, de los que ambos pueden ser diagnóstico de un estado anormal o fisiológico específico o de enfermedad. Esta invención contempla anticuerpos desarrollados contra secuencias de aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótido que se muestra en SEQ ID NO: 1, o fragmentos de proteínas que la contienen. En particular, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión o que se desarrollan contra fragmentos específicos que se estima que se extienden fuera de la bicapa lipídica, extracelular o intracelular.

La presente invención contempla el aislamiento de variantes adicionales de especies estrechamente relacionadas. Un análisis por inmunotransferencia de Southern y Northern debería establecer que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos. Es probable que las 312C2 estén ampliamente extendidas en variantes de especies, por ejemplo, roedores, lagomorfos, carnívoros, artiodáctilos, perisodáctilos y primates.

La invención también proporciona medios para aislar un grupo de antígenos relacionados que manifiestan tanto diferencias como similitudes en estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las moléculas se acelerará grandemente mediante el aislamiento y la caracterización de variantes adicionales de especies distintas de ellos. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

Los genes aislados permitirán la transformación de células que carecen de expresión de una correspondiente 312C2, por ejemplo, tanto tipos de especies como células que carecen de los antígenos correspondientes y exhiben actividad de fondo negativa. Esto debería permitir el análisis de la función de 312C2 en comparación con células de control sin transformar.

Es posible la disección de elementos estructurales críticos que efectúan las diversas funciones de activación o diferenciación intermediadas a través de estos antígenos usando técnicas estándar de biología molecular moderna, particularmente para comparar miembros de la clase relacionada. Véanse, por ejemplo, la técnica de mutagénesis de escaneado-homólogo que se describe en Cunningham, y col. (1989) *Science* 243:1339-1336; y aproximaciones usadas en O'Dowd, y col. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechleiter, y col. (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390.

Las funciones intracelulares probablemente implicarían a segmentos del antígeno que fueran normalmente accesibles al citosol. Sin embargo, puede ocurrir la internalización de proteína bajo ciertas circunstancias, y puede ocurrir la interacción entre componentes intracelulares y segmentos "extracelulares". Los segmentos específicos de interacción de 312C2 con otros componentes intracelulares pueden ser identificados mediante mutagénesis o medios bioquímicos directos, por ejemplo, procedimientos de reticulación o afinidad. También será aplicable el análisis estructural mediante procedimientos cristalográficos u otros procedimientos físicos. La investigación adicional del mecanismo de transducción de señales incluirá el estudio de compuestos asociados que pueden ser aislables mediante procedimientos de afinidad o mediante procedimientos genéticos, análisis de complementación de mutantes.

Se continuará profundizando en el estudio adicional de la expresión y control de 312C2. Los elementos controlantes asociados con los antígenos deberían exhibir patrones de expresión diferenciales fisiológicos, de desarrollo, específicos para los tejidos, u otros. Son de interés las regiones genéticas aguas arriba o aguas abajo, por ejemplo, elementos de control. En particular, variantes fisiológicas o de desarrollo, por ejemplo, se han encontrado formas múltiples procesadas alternativamente del antígeno de ratón. Véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. Así, el empalme de mensaje diferencial puede conducir a un surtido de formas unidas a membrana, formas solubles, y versiones modificadas de antígeno.

Con 312C2 humana, se han aislado 6 formas procesadas alternativamente. El clon A8 es una forma truncada de 312C2 en la que faltan 7 aminoácidos inmediatamente después del dominio transmembrana. Véase SEQ ID NO: 6. El clon A5 es idéntico a 312C2 respecto a los 105 primeros aminoácidos. Se cree que la divergencia puede ser debida a un intrón no empalmado. Véase SEQ ID NO: 7. El clon G10 es idéntico a 312C2 respecto a los 202 primeros aminoácidos, pero luego varía en los 11 aminoácidos después del dominio transmembrana y es 76 aminoácidos más largo en el dominio intracelular. El dominio intracelular de G10 no contiene dominio muerto. Véase SEQ ID NO: 8.

Los estudios estructurales de los antígenos conducirán al diseño de nuevos antígenos, particularmente análogos que exhiban propiedades agonistas o antagonistas en la molécula. Esto se puede combinar con los procedimientos de examen previamente descritos para aislar antígenos que exhiban el espectro de actividades deseado.

IV. Anticuerpos

Se pueden desarrollar anticuerpos para diversas 312C2, que incluyen variantes de especies, polimórficas, o alélicas, y fragmentos de las mismas, tanto en sus formas que se producen naturalmente como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, se pueden desarrollar anticuerpos para 312C2 indistintamente en sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones nativas o desnaturalizadas. También se contemplan anticuerpos anti-idiotipos.

Se pueden desarrollar anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones de cadena sencilla, contra fragmentos predeterminados de los antígenos mediante inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunogénicas. Se preparan anticuerpos monoclonales a partir de células que segregan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos se pueden examinar respecto a unión a 312C2s normales o defectuosas, o se pueden examinar respecto a actividad agonística o antagonística, por ejemplo, intermediada a través del antígeno o su compañero de unión. Los anticuerpos pueden ser agonísticos o antagonísticos, por ejemplo, bloqueando estéricamente la unión del ligando. Estos anticuerpos monoclonales se unirán habitualmente con al menos un K_D de aproximadamente 1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 300 μ M, típicamente al menos aproximadamente 100 μ M, más típicamente al menos aproximadamente 30 μ M, preferiblemente al menos aproximadamente 10 μ M, y más preferiblemente al menos aproximadamente 3 μ M o mejor.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no-neutralizantes, se pueden examinar respecto a la capacidad para unirse a los antígenos sin inhibir la unión por un compañero. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitivos. También pueden ser útiles para detectar o cuantificar proteína 312C2 o sus compañeros de unión. Véanse, por ejemplo, Chan (ed.) (1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FLA; Price and Newman (eds.) (1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; y Ngo (ed.) (1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y. Absorciones cruzadas u otras pruebas identificarán los anticuerpos que exhiban diversos espectros de especificidades, por ejemplo, especificidades únicas o compartidas de especies.

Además, los anticuerpos, incluyendo fragmentos que se unen a antígenos, de esta invención pueden ser potentes antagonistas que se unen al antígeno e inhiben la unión funcional o inhiben la capacidad de un compañero de unión para emitir una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y se pueden acoplar a toxinas o radionúclidos de manera que cuando el anticuerpo se une al antígeno, una célula que lo exprese, por ejemplo en su superficie, es sacrificada. Además, estos anticuerpos se pueden conjugar con fármacos u otros agentes terapéuticos, tanto directamente como indirectamente por medio de un vínculo, y pueden efectuar direccionamiento de fármaco a diana.

Los fragmentos de antígeno se pueden juntar con otros materiales, particularmente polipéptidos, como polipéptidos fusionados o juntados de modo covalente para ser usados como inmunógenos. Un antígeno y sus fragmentos se pueden fusionar o vincular de modo covalente con una diversidad de inmunógenos, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero bovino, toxoide de tétanos, etc. Véanse *Microbiology*, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, Nueva York; Williams, y col. (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, vol. 1, Academic Press, Nueva York; y Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY, respecto a descripciones de procedimientos para preparar antisueros policlonales.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos huéspedes mamíferos, tales como ratón, roedores, primates, seres humanos, etc. Descripción de técnicas para preparar anticuerpos monoclonales de este tipo se puede encontrar, por ejemplo, en Stites, y col. (eds.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en este documento; Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed. Academic Press, Nueva York; y particularmente en Kohler and Milstein (1975) en *Nature* 256:495-497, que describe un procedimiento de generar anticuerpos monoclonales.

Otras técnicas adecuadas implican exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativamente a selección de bancos de anticuerpos en vectores fago o similares. Véanse, Huse, y col. (1989) "Generation of Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281; y Ward, y col. (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente los polipéptidos y anticuerpos se marcarán juntando, o bien de modo covalente o bien de modo no covalente, una sustancia que proporcione una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se han reseñado extensamente tanto en la bibliografía científica como en la de patentes. Marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Patentes que enseñan el uso de marcadores de este tipo incluyen patentes de EE.UU. N^{os} 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. También se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véanse Cabilly, patente de EE.UU. N^o 4.816.567; Moore, y col. patente de EE.UU. N^o 4.642.334; y Queen, y col. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 86:10029-10033.

Los anticuerpos de esta invención también se pueden usar para cromatografía de afinidad para aislar la proteína. Se pueden preparar columnas en las que los anticuerpos se vinculan a un soporte sólido. Véase, por ejemplo, Wilchek y col. (1984) *Meth. Enzymol.* 104:3-55.

Anticuerpos desarrollados contra cada 312C2 también serán útiles para desarrollar anticuerpos anti-idiotipos. Éstos serán útiles para detectar o diagnosticar diversas dolencias inmunológicas relacionadas con la expresión de los respectivos antígenos.

V. Ácidos nucleicos

Las secuencias de péptido descritas y los reactivos relacionados son útiles para detectar, aislar, o identificar un clon de ADN que codifica 312C2, por ejemplo, de una fuente natural. Típicamente, será útil para aislar un gen de mamífero, y se aplicarán procedimientos similares para aislar genes de otras especies, por ejemplo, animales de sangre caliente tales como aves y mamíferos. La hibridación cruzada permitirá aislamiento de 312C2 de otras especies. Un cierto número de diferentes aproximaciones debería estar disponible para aislar con éxito un clon de ácido nucleico adecuado.

La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante procedimientos estándar, según se describe anteriormente. Péptidos sintéticos o proteína purificada se pueden presentar a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véanse, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Alternativamente, se puede usar la 312C2 como un reactivo de unión específico, y se puede aprovechar su especificidad de unión, más que si se hubiera usado un anticuerpo.

Por ejemplo, la composición de unión específica se podría usar para examen de un banco de expresiones hechas de una línea celular que expresa una 312C2. El examen puede ser tinción estándar de la superficie que expresa antígeno, o mediante separación por cribado. El examen de la expresión intracelular también se puede realizar mediante diversos procedimientos de tinción o inmunofluorescencia. Las composiciones de unión se podrían usar para purificar por afinidad o poner en orden las células que expresan la proteína.

Los segmentos de péptido también se pueden usar para estimar los oligonucleótidos apropiados para examinar un banco. El código genético se puede usar para seleccionar oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para examen. Véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 ó 3. En combinación con técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles para seleccionar clones correctos de un banco. Secuencias complementarias también se usarán como sondas, iniciadores, o filamentos antisentido. Sobre la base de la identificación del dominio extracelular probable, diversos fragmentos deberían ser particularmente útiles, por ejemplo, emparejados con vector anclado o técnicas de PCR de poli-A complementario o con ADN complementario u otros péptidos.

Esta invención contempla el uso de ADN aislado o fragmentos para codificar el correspondiente polipéptido de 312C2 biológicamente activo. Además, esta invención cubre ADN aislado o recombinante que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activo que es capaz de hibridación bajo condiciones apropiadas con las secuencias de ADN que se describen en este documento. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser un antígeno intacto, o fragmento, y tiene una secuencia de aminoácidos que se describe, por ejemplo, en SEQ ID NO: 1. Además, esta invención cubre el uso de ADN aislado o recombinante, o fragmentos del mismo, que codifican proteínas que son homólogas de 312C2 o que fueron aislada usando ADNc que codifica una 312C2 como sonda. El ADN aislado puede tener las respectivas secuencias de regulación en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, mejoradores, señales de adición de poli-A, y otros.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN, o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otros componentes que acompañan naturalmente a una secuencia nativa, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y/o secuencias genómicas flanqueadoras de las especies originarias. El término engloba una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido retirada de su medio en el que se produce naturalmente, e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente mediante sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. Generalmente, el ácido nucleico estará en un vector o fragmento de menos de aproximadamente 50 Kb, habitualmente de menos de aproximadamente 30 Kb, típicamente de menos de aproximadamente 10 Kb, y preferiblemente de menos de aproximadamente 6 Kb.

Un ácido nucleico aislado generalmente será una composición homogénea de moléculas, pero en algunas realizaciones, contendrá alguna heterogeneidad menor. Esta heterogeneidad típicamente se encuentra en los extremos del polímero o en porciones no críticas para la función o actividad biológica deseada.

Un ácido nucleico "recombinante" se define tanto por su procedimiento de producción como por su estructura. Con referencia a su procedimiento de producción, por ejemplo, un producto hecho mediante un proceso, el proceso es el de usar técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, implicando intervención humana en la secuencia del nucleótido, típicamente selección y producción. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico que se hace generando una secuencia que comprende fusión de dos fragmentos que no son naturalmente contiguos entre sí, pero se quiere dar a entender que excluye productos de la naturaleza, por ejemplo mutantes que se producen naturalmente. Así, por ejemplo, se abarcan productos que se hacen transformando células con cualquier vector que se produce de modo no natural, como son los ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que se deriva de usar cualquier proceso de oligonucleótido sintético. Esto se hace a menudo para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o uno conservador, al tiempo que se introduce o retira un sitio de reconocimiento de secuencia.

Alternativamente, se realiza la práctica de juntar segmentos de ácido nucleico de funciones deseadas para generar una entidad genética única que comprende una combinación deseada de funciones que no se encuentra en las formas naturales comúnmente disponibles. A menudo, los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son la diana

de manipulaciones artificiales de este tipo, pero otras dianas específicas de sitios, por ejemplo, promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias de regulación, secuencias de control, u otros perfiles útiles pueden ser incorporados mediante diseño. Un concepto similar se pretende para un polipéptido recombinante, por ejemplo, fusión. Se incluyen específicamente, ácidos nucleicos sintéticos que, mediante redundancia de código genético, codifican polipéptidos similares con fragmentos de estos antígenos, y fusiones de secuencias de diversas variantes de especies diferentes.

Un "fragmento" significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente 22 nucleótidos, comúnmente al menos aproximadamente 29 nucleótidos, más a menudo al menos aproximadamente 35 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 41 nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 47 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 55 nucleótidos, y en realizaciones particularmente preferidas será al menos aproximadamente 60 nucleótidos o más.

Un ADN que codifica una proteína 312C2 será particularmente útil para identificar especies de genes, ARNm, y ADNc que codifiquen proteínas relacionadas u homólogas, así como ADNs que codifiquen proteínas homólogas de diferentes especies. Probablemente haya homólogos en otras especies, que incluyen primates roedores, y aves. Diversas proteínas 312C2 deberían ser homólogas y se abarcan en este documento. Sin embargo, incluso proteínas que tienen una relación evolutiva más distante al antígeno se pueden aislar fácilmente bajo condiciones apropiadas usando esas secuencias si son suficientemente homólogas. Son de particular interés las proteínas 312C2 de primate.

Clones recombinantes derivados de las secuencias genómicas, por ejemplo, que contienen intrones, serán útiles para estudios de transgénicos, que incluyen, por ejemplo, células y organismos transgénicos y para terapia génica. Véanse, por ejemplo, Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roit (ed.) *Encyclopedia of Immunology*, Academic Press, San Diego, págs. 1502-1504; Travis (1992) *Science* 256:1392-1394; Kuhn, y col. (1991) *Science* 254:707-710; Capecchi (1989) *Science* 244:1288; Robertson (1987) (ed.) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology* 10:180-199.

Homología sustancial en el contexto de comparación de secuencia de ácido nucleico quiere dar a entender que tanto los segmentos, como sus filamentos complementarios, cuando se comparan, son idénticos cuando se alinean óptimamente, con inserciones o supresiones de nucleótidos apropiadas, en al menos 50% de los nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente 58%, comúnmente al menos aproximadamente 65%, a menudo en al menos aproximadamente 71%, típicamente al menos aproximadamente 77%, habitualmente al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 95 a 98% o más, y en realizaciones particulares tan alto como aproximadamente 99% o más de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se van a hibridar bajo condiciones selectivas de hibridación, a un filamento, o a su complemento, típicamente usando una secuencia de 312C2, por ejemplo, en SEQ ID NO: 1. Típicamente, ocurrirá hibridación selectiva cuando haya homología de al menos aproximadamente 55% sobre un tramo de al menos 30 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 75% sobre un tramo de aproximadamente 25 nucleótidos, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% sobre aproximadamente 20 nucleótidos. Véase, Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12:203-213. La longitud de comparación de homología, según se describe, puede ser sobre tramos más largos, y en ciertas realizaciones será sobre un tramo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 40 nucleótidos, y preferiblemente al menos aproximadamente 75 a 100 nucleótidos o más.

Condiciones rigurosas, en lo referente a homología en el contexto de hibridación, serán condiciones combinadas rigurosas de sal, temperatura, solventes orgánicos, y otros parámetros, típicamente los que se controlan en reacciones de hibridación. Condiciones rigurosas de temperatura incluirán habitualmente temperaturas que exceden de aproximadamente 30°C, habitualmente que exceden de aproximadamente 37°C, típicamente que exceden de aproximadamente 55°C, preferiblemente que exceden de aproximadamente 70°C. Condiciones rigurosas de sal serán comúnmente menos de aproximadamente 1000 mM, habitualmente menos de aproximadamente 400 mM, típicamente menos de aproximadamente 250 mM, preferiblemente de menos de aproximadamente 150 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro sencillo. Véase, por ejemplo, Wetmur and Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31:349-370.

Se puede clonar y aislar 312C2 de otras especies de mamíferos mediante hibridación cruzada de especies de unas especies estrechamente relacionadas. La homología puede que sea relativamente baja entre especies relacionadas de modo distante, y así es aconsejable la hibridación de especies relacionadas relativamente próximas. Alternativamente, la preparación de un anticuerpo que exhibe menos especificidad a las especies puede ser útil en aproximaciones de clonación de expresión.

VI. Elaboración de 312C2; Miméticos

Se puede obtener ADN que codifica la 312C2 o fragmentos de la misma, examinando bancos de ADNc, o examinando bancos genómicos preparados a partir de una amplia diversidad de líneas celulares o muestras de tejido. Véanse, por ejemplo, Okayama and Berg (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2:161-170; Gubler and Hoffman (1983) *Gene* 25:263-269; y Glover (ed.) (1984) *DNA Cloning: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford. Alternativamente, las secuencias proporcionadas en este documento proporcionan iniciadores de PCR útiles o permiten la preparación sintética u otra preparación de genes adecuados que codifican una 312C2, incluso, realizaciones que se producen naturalmente.

Este ADN se puede expresar en una amplia diversidad de células huésped para la síntesis de 312C2 de longitud completa o fragmentos que pueden ser usados a su vez, por ejemplo, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios de uniones; para construcción y expresión de moléculas modificadas; y para estudios de estructura/función.

5 Vectores, según se usan en este documento, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables, y otros vehículos que facilitan la integración de ADN en el genoma del huésped. Véanse, por ejemplo, Pouwels, y col. (1985 y suplementos) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y.; y Rodríguez, y col. (1988) (eds.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

10 Para los fines de esta invención, secuencias de ADN están operativamente vinculadas cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder segregador está operativamente vinculado a un polipéptido si se expresa como una preproteína o participa en dirigir el polipéptido a la membrana celular o en la segregación del polipéptido. Un promotor está operativamente vinculado a una secuencia codificadora si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión de ribosoma está operativamente vinculado a una secuencia codificadora si está situado para permitir la translación. Habitualmente, operativamente vinculado dar a entender contiguo y en marco de lectura, sin embargo, ciertos elementos genéticos tales como genes represores no están vinculados de modo contiguo sino que aun se unen a secuencias operadoras que a su vez controlan la expresión. Véanse, por ejemplo, Rodríguez, y col. Chapter 10, págs. 205-236; Balbas and Bolivar (1990) *Methods in Enzymology* 185:14-37; y Ausubel, y col. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, NY.

Ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama, y col. (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMC1neo Poly-A, véase Thomas, y col. (1987) *Cell* 51:503-512; y un vector de baculovirus tal como pAC 373 ó pAC 610. Véase, por ejemplo, Miller (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177-199.

25 A menudo se deseará expresar un polipéptido 312C2 en un sistema que proporcione un patrón de glicosilación específico o definido. Véanse, por ejemplo Luckow and Summers (1988) *Bio/Technology* 6:47-55; y Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:487-511.

30 La 312C2 o un fragmento de la misma pueden ser sometidos a técnicas de ingeniería para que se vincule fosfatidil inositol (PI) a una membrana celular, pero que se pueda retirar de membranas mediante tratamiento con enzima troceadora de fosfatidil inositol, por ejemplo, fosfatidil inositol fosfolipasa-C. Ésta libera el antígeno en una forma biológicamente activa, y permite purificación mediante procedimientos estándar que química de proteínas. Véanse, por ejemplo, Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse, y col. (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner, y col. (1991) *J. Cell. Biol.* 114:1275-1283.

Ahora que 312C2 ha sido caracterizada, se pueden preparar fragmentos o derivados de la misma mediante procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Éstos incluyen procedimientos tales como los que se describen en Stewart and Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky and Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; y Villafranca (ed.) (1991) *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, Ca.

45 VII. Usos

La presente invención proporciona reactivos que encontrarán uso en aplicaciones de diagnóstico según se describe en otra parte de este documento, por ejemplo, en la descripción general respecto a dolencias intermediadas por células T, o después en la descripción de kits para diagnóstico.

50 Esta invención también proporciona reactivos con valor terapéutico significativo. La 312C2 (que se produce naturalmente o recombinante), fragmentos de la misma, y anticuerpos para la misma, junto con compuestos identificados como poseedores de afinidad de unión con 312C2, deberían ser útiles en el tratamiento de dolencias asociadas con fisiología o desarrollo anormal, que incluyen proliferación anormal, por ejemplo dolencias cancerosas, o dolencias degenerativas. En particular, se logrará la modulación del desarrollo de células linfoides mediante tratamiento terapéutico apropiado usando las composiciones que se proporciona en este documento. Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con expresión anormal o señalización anormal mediante una 312C2 debería ser una posible diana para un agonista o antagonista del antígeno. El antígeno desempeña un papel en la regulación y el desarrollo de células hematopoyéticas, por ejemplo, células linfoides, que afectan a las respuestas inmunológicas, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios.

60 En particular, el antígeno probablemente proporcionará una señal coestimuladora para activación de células T. Así, la 312C2 intermediará probablemente interacciones de células T con otros tipos de células. Estas interacciones conducen, en contextos particulares, a proliferación celular, síntesis mejorada de citocina por las células, y consecuente amplificación de proliferación de células T.

65 Asimismo, la 312C2 ó antagonistas podrían redireccionar las respuestas de células T, por ejemplo, hacia un sistema de transducción de señales Th0/Th1, o hacia una respuesta de tipo Th2. Entre estos agonistas, deberían estar

diversos anticuerpos que reconozcan los epítomos apropiados, por ejemplo, que imiten la unión de 312C2 a su ligando. Alternativamente, antagonistas de anticuerpos se pueden unir a epítomos que estéricamente pueden bloquear la unión de ligando.

5 Recíprocamente, antagonistas de 312C2, tales como la forma segregada de 312C2 que se producen naturalmente, o anticuerpos bloqueantes, pueden proporcionar una manera selectiva y poderosa para bloquear respuestas inmunitarias en situaciones anormales, por ejemplo trastornos autoinmunitarios, que incluyen artrosis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmunitaria de Hashimoto, así como respuestas autoinmunitarias agudas y crónicas en las que activación de células T, expansión, y/o la memoria inmunológica de células T desempeña un papel importante. Véase también Samter, y col. (eds) *Immunological Diseases* vols. 1 y 2, Little, Brown and Co. La supresión de la activación, expansión y/o liberación de citocina de células T por la forma de 312C2 segregada que se produce naturalmente, que se puede producir en grandes cantidades mediante procedimientos recombinantes, o mediante anticuerpos bloqueantes, debería ser eficaz en muchos trastornos en los que respuestas de células T anormales o indeseadas son de importancia, por ejemplo en una situación de rechazo de trasplante.

15 Además, ciertas composiciones de combinación con otros moduladores de transmisión de señales de células T serían útiles. Otras moléculas señalizadoras de este tipo incluyen reactivos TcR, CD40, CD40L, CTLA-8, CD28, SLAM, FAS, y sus antagonistas respectivos.

20 Se conocen diversas dolencias anormales en cada uno de los tipos de células que se ha mostrado que poseen ARNm 312C2 mediante análisis por inmunotransferencia de Northern. Véanse Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn, y col. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y.; y Weatherall, y col. (eds.) *Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford. Muchas otras dolencias y enfermedades médicas implican a células T o son intermediadas por células T, y muchas de ellas responderán al tratamiento con un agonista o antagonista proporcionado en este documento. Véanse, por ejemplo, Stites and Terr (eds; 1991) *Basic and Clinical Immunology* Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut; y Samter, y col. (eds) *Immunological Diseases* Little, Brown and Co. Esos problemas deberían ser susceptibles de prevención o tratamiento usando composiciones que se proporcionan en este documento.

30 Anticuerpos de 312C2 pueden ser purificados y luego administrados a un paciente, de veterinaria o ser humano. Estos reactivos se pueden combinar para uso terapéutico con ingredientes adicionales activos o inertes, por ejemplo, en vehículos o diluyentes convencionales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo adyuvantes inmunogénicos, junto con estabilizantes fisiológicamente inocuos, excipientes o conservantes. Estas combinaciones se pueden filtrar en medio estéril y colocarse en formas de dosificación mediante liofilización en viales de dosificación o almacenarse en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención también contempla el uso de anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, que incluyen formas que no son uniones de complemento.

40 Se puede realizar examen de fármacos usando 312C2 o fragmentos de la misma para identificar compuestos que tienen afinidad de unión, u otros efectos biológicos relevantes, sobre funciones de 312C2, incluyendo aislamiento de componentes asociados. A continuación se pueden realizar ensayos biológicos posteriores para determinar si el compuesto tiene actividad estimulante intrínseca y es por lo tanto un bloqueador o antagonista porque bloquea la actividad del antígeno. De modo similar, un compuesto que tiene actividad estimulante intrínseca puede activar el sistema de transducción de señales y es así un agonista porque estimula la actividad de 312C2. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos bloqueantes para 312C2 como antagonistas y de anticuerpos estimulatorios, por ejemplo, A12, como agonistas. Esta aproximación debería ser particularmente útil con otras variantes de especies de 312C2.

50 Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Así, las dosificaciones de tratamiento deberían ser calibradas para optimizar seguridad y eficacia. Típicamente, las dosificaciones usadas *in vitro* pueden proporcionar orientación útil sobre las cantidades útiles para administración *in situ* de estos reactivos. Pruebas en animales de dosis eficaces para tratamiento de trastornos particulares proporcionarán indicación predictiva adicional de la dosificación humana. Se describen diversas consideraciones, por ejemplo, en Gilman, y col. (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Procedimientos para administración se describen en este documento y a continuación, por ejemplo para administración oral, intravenosa intraperitoneal, o intramuscular, difusión transdérmica y otras. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, suero salino, tampones, y otros compuestos que se describen, por ejemplo, en el *Merck Index*, Merck & Co., Rahway, Nueva Jersey. Se esperaría comúnmente que los intervalos de dosificación estuvieran en cantidades más bajas de concentraciones de 1mM, típicamente menos de concentraciones de aproximadamente 10 μ M, habitualmente menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 pM (picomolar), y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo apropiado. Formulaciones de liberación retardada o aparatos de liberación retardada se utilizarán a menudo para administración continua o a largo plazo. Véase, por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249:1527-1533.

65 Se pueden administrar 312C2, fragmentos de la misma, y anticuerpos para ella o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, directamente al huésped que se ha de tratar o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugarlos con proteínas vehículo tales como ovoalbúmina o seroalbúmina antes de su administración. Se

pueden administrar formulaciones terapéuticas en muchas formulaciones de dosificación convencional. Aun cuando es posible que el ingrediente activo sea administrado solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden típicamente al menos un ingrediente activo, según se define anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables del mismo. Cada vehículo debería ser aceptable tanto farmacéuticamente como fisiológicamente en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes y no ser perjudicial para el paciente. Las formulaciones incluyen las que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica, o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Véanse, por ejemplo Gilman, y col. (eds.) (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th Ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, y col. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, Nueva York; Lieberman, y col. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, Nueva York; y Lieberman, y col. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, Nueva York. La terapia de esta invención se puede combinar o usar en asociación con otros agentes, por ejemplo, otros moduladores de activación de células T, por ejemplo CD40, ligando de CD40, CD28, CTLA-4, B7, B70, SLAM, entidades señalizadoras de receptor de células T, o sus respectivos antagonistas.

Tanto la forma que se produce naturalmente como la recombinante de esta invención son particularmente útiles en kits y procedimientos de análisis que son capaces de examinar compuestos respecto a la actividad de unión a las proteínas. Se han desarrollado varios procedimientos de automatizar ensayos en los últimos años de modo que permitan el examen de decenas de miles de compuestos en un período corto. Véase, por ejemplo, Fodor, y col. (1991) *Science*, 251:767-773, que describe medios para pruebas de afinidad de unión mediante una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados se puede facilitar grandemente mediante la disponibilidad de grandes cantidades de 312C2 purificada, soluble según se proporciona por esta invención.

Se pueden usar otros procedimientos para determinar los restos críticos en las interacciones 312C2-ligando 312C2. Se puede realizar análisis mutacional, por ejemplo, véase Somoza, y col. (1993) *J. Exptl. Med.* 178:549-558, para determinar restos críticos específicos en la interacción y/o señalización. Tanto los dominios extracelulares, implicados en la interacción homofílica, como el dominio intracelular, que proporciona interacciones importantes en señalización intracelular.

Por ejemplo, se pueden encontrar normalmente antagonistas una vez que el antígeno ha sido definido estructuralmente, por ejemplo, mediante datos de estructura terciaria. Es ahora posible la prueba de análogos potenciales que interactúan tras el desarrollo de procedimientos de ensayo muy automatizados usando 312C2 purificada. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas usando técnicas de examen que se describen en este documento. Son de particular importancia los compuestos que se ha encontrado que tienen una afinidad de unión combinada para un espectro de moléculas de 312C2, por ejemplo, compuestos que pueden servir como antagonistas para variantes de especies de 312C2.

Un procedimiento de examen de fármacos utiliza células huésped eucariotas o procariotas que se transforman establemente con moléculas de ADN recombinante que expresan una 312C2. Se pueden aislar células que expresen una 312C2 en aislamiento de otras moléculas. Células de este tipo, en forma tanto viable como fija, se pueden usar para ensayos de unión de compañero de unión estándar. Véanse también, Parce, y col. (1989) *Science* 246:243-247; y Owicki, y col. (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 87:4007-4011, que describen procedimientos sensibles para detectar respuestas celulares.

Otra técnica para examen de fármacos implica una aproximación que proporciona alto rendimiento de examen para compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a 312C2 y se describe con detalle en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de Septiembre de 1984. En primer lugar, se sintetiza gran número de diferentes compuestos pequeños de péptidos de prueba sobre un sustrato sólido, por ejemplo, clavijas de plástico o alguna otra superficie apropiada, véase Fodor, y col. (1991). A continuación todas las clavijas se hacen reaccionar con 312C2 solubilizada, impurificada o solubilizada, purificada, y se lavan. La siguiente etapa implica detectar 312C2 unida.

El diseño racional de fármaco también puede estar basado en estudios estructurales de las formas moleculares de la 312C2 y otros efectores o análogos. Pueden ser efectores otras proteínas que intermedian otras funciones en respuesta a la unión, u otras proteínas que normalmente interaccionan con 312C2. Un medio para determinar los sitios que interaccionan con otras proteínas específicas es la determinación de estructura física, por ejemplo, cristalografía de rayos-X o técnicas de RMN bidimensional. Esto proporcionará orientación en cuanto a los restos aminoácidos que forman regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase, por ejemplo, Blundell and Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, Nueva York.

VIII. Kits

Esta invención también contempla el uso de proteínas 312C2, fragmentos de las mismas, péptidos y sus productos de fusión en una diversidad de kits y procedimientos de diagnóstico para detectar la presencia de otra 312C2 o compañero de unión. Típicamente el kit tendrá un compartimento que contenga o bien un péptido 312C2 definido o segmento de gen o un reactivo que reconoce a uno u otro, por ejemplo fragmentos de 312C2 ó anticuerpos.

ES 2 308 787 T3

Un kit para determinar la afinidad de unión de un compuesto de prueba a una 312C2 comprendería típicamente un compuesto de prueba; un compuesto marcado, por ejemplo un compañero de unión o anticuerpo que tiene afinidad de unión conocida para 312C2; una fuente de 312C2 (que se produce naturalmente o recombinante); y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, tal como una fase sólida para inmovilizar la molécula. Una vez que se han examinado los compuestos, los que tienen adecuada afinidad de unión al antígeno pueden ser evaluados en ensayos biológicos adecuados, según son bien conocidos en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o antagonistas para el sistema de transducción de señales SALM. La disponibilidad de polipéptidos 312C2 recombinantes también proporciona patrones bien definidos para calibrar ensayos de este tipo.

Un kit preferido para determinar la concentración, por ejemplo, de una 312C2 en una muestra debería comprender típicamente un compuesto marcado, por ejemplo, compañero de unión o anticuerpo que tiene afinidad de unión conocida para el antígeno, una fuente de antígeno (que se produce naturalmente o recombinante) y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo, una fase sólida para inmovilizar la 312C2. Se proporcionarán normalmente compartimentos que contienen reactivos, e instrucciones.

Anticuerpos, que incluyen fragmentos de unión de antígeno, específicos para la 312C2 o fragmentos son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de 312C2 y/o sus fragmentos. Ensayos de diagnóstico de este tipo pueden emplear lisatos, células vivas, células fijadas, inmunoluminiscencia, cultivos celulares, fluidos corporales, y adicionalmente pueden implicar la detección de antígenos relacionados con el antígeno en suero, o similares. Los ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos (sin etapa de separación entre el reactivo libre y el complejo antígeno-compañero de unión) o heterogéneo (con una etapa de separación). Existen diversos ensayos comerciales, tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunosorbente vinculado a enzimas (ELISA), inmunoensayo de enzimas (EIA), técnica de inmunoensayo multiplicado de enzimas (EMIT), inmunoensayo fluorescente de sustrato marcado (SLFIA), y similares. Véanse, por ejemplo, Van Vunakis, y col. (1980) *Meth. Enzymol.* 70:1-525; Harlow and Lane (1980) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY; y Coligan, y col. (eds.) (1993) *Current Protocols in Immunology*, Greene and Wiley, NY.

Anticuerpos anti-idiotipos pueden tener uso similar para diagnosticar presencia de anticuerpos contra una 312C2, tal como puede ser el diagnóstico de diversos estados anormales. Por ejemplo, sobreproducción de 312C2 puede dar como resultado la producción de diversas reacciones inmunológicas que pueden ser diagnóstico de estados fisiológicos anormales, particularmente en dolencias celulares proliferativas tales como cáncer o activación o diferenciación anormal.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se suministran en kits, de modo que se optimice la sensibilidad del ensayo. Para el tema de la invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, se proporciona el protocolo, y el marcador, anticuerpo ya sea marcado o no marcado o compañero de unión, o 312C2 marcada. Ésta habitualmente está en conjunción con otros aditivos tales como tampones, estabilizante, materiales necesarios para la producción de señales tales como sustratos para enzimas, y similares. Preferiblemente, el kit también contendrá instrucciones para el uso apropiado y eliminación de los contenidos después de uso. Típicamente el kit tiene compartimentos para cada reactivo útil. Deseablemente, los reactivos se proporcionan como polvo seco liofilizado, y los reactivos se pueden reconstituir en un medio acuoso proporcionando concentraciones apropiadas de reactivos para realizar el ensayo.

Muchos de los constituyentes anteriormente mencionados de los ensayos de examen de fármacos y diagnóstico se pueden usar sin modificación o se pueden modificar en una diversidad de maneras. Por ejemplo, el marcado se puede lograr juntando un resto de modo covalente o no covalente que directamente o indirectamente proporciona una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos el compañero de unión, compuesto de prueba, 312C2, o anticuerpos para la misma puede ser marcado directamente o indirectamente. Las posibilidades para marcado directo incluyen grupos de marcadores: radiomarcadores tales como ¹²⁵I, enzimas (pat. EE.UU. n° 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (pat. EE.UU. N° 3.940.475) capaz de vigilar el cambio en intensidad de fluorescencia, salto de longitud de onda, o polarización de fluorescencia. Las posibilidades para marcado indirecto incluyen biotilación de un constituyente seguida de unión a avidina acoplada a uno de los grupos de marcadores anteriores.

También hay numerosos procedimientos para separar la 312C2 unida de la libre, o alternativamente el compuesto de prueba unido del libre. La 312C2 puede ser inmovilizada sobre diversas matrices y a continuación lavar. Matrices adecuadas incluyen plástico tal como placa de ELISA, filtros y gránulos. Véase, por ejemplo, Coligan, y col. (eds.) (1993) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Chapter 2, Greene and Wiley, NY. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el procedimiento de la partícula magnetizable de anticuerpo fluorescente que se describe en Rattle, y col. (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación de partícula magnética de anticuerpo doble según se describe en pat. EE.UU. N° 4.659.678.

Procedimientos para vincular proteínas o sus fragmentos a diversos marcadores han sido extensamente reseñados en la bibliografía y no requieren descripción detallada en este documento. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados, o bien a través del uso de carbodiimida o ésteres activos para formar enlaces de péptido, o la formación de tioéteres mediante reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloroacetilo, o una olefina activada tal como maleimida, para vinculación, o similares. Las proteínas de fusión también encontrarán uso en estas aplicaciones.

Otro aspecto de diagnóstico de esta invención implica el uso de secuencias de oligonucleótido o polinucleótido tomadas de la secuencia de una 312C2. Estas secuencias se pueden usar como sondas para detectar niveles del mensaje de 312C2 en muestras de pacientes de los que se sospecha que tienen una dolencia anormal, por ejemplo, cáncer o problema de desarrollo. Puesto que el antígeno es un marcador para activación, puede ser útil para determinar el número de células T activadas a determinar, por ejemplo, cuando se pueda requerir supresión adicional. La preparación de ambas secuencias de nucleótido ARN y ADN, el marcado de las secuencias, y el tamaño preferido de las secuencias han recibido amplia descripción y discusión en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Langer-Safer, y col. (1982) *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 79:4381-4385; Caskey (1987) *Science* 236:962-967; y Wilchek, y col. (1988) *Anal. Biochem.* 171:1-32.

También se contemplan kits de diagnóstico que también prueban la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. Diagnóstico o pronóstico pueden depender de la combinación de múltiples indicaciones usadas como marcadores. Así, los kits pueden probar combinaciones de marcadores. Véase, por ejemplo, Viallet, y col. (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97. Otros kits se pueden usar para evaluar subconjuntos de células T.

IX. Procedimientos para aislar compañeros de unión específica de 312C2

La proteína 312C2 debería interactuar con un ligando basado, por ejemplo, en la similitud de estructura y función con otros antígenos de la superficie celular que exhiben similar estructura y especificidad de tipo de célula de expresión. Procedimientos para aislar un ligando se hacen disponibles por la capacidad para hacer 312C2 purificada para programas de examen. Constructos solubles u otros que usan las secuencias de 312C2 proporcionadas en este documento permitirán el examen o aislamiento de ligandos específicos de 312C2. Existen muchos procedimientos respecto a clonación de expresión, separación por cribado, aislamiento por afinidad, u otros medios para identificar un ligando receptor.

En la presente invención se usa una diversidad de diferentes ensayos para detectar compuestos capaces de unirse a 312C2. Por ejemplo, la unión de un compuesto de prueba a 312C2 ó un fragmento de péptido de la misma se puede medir directamente en presencia o ausencia de polipéptido de 312C2. Este último tipo de ensayo se denomina ensayo de unión directo. Además, compuestos que inhiben la unión de 312C2 a anticuerpos específicos, preferiblemente monoclonales, pueden ser identificados en ensayos de unión competitivos. Se pueden usar tanto ensayos de unión directos como ensayos de unión competitivos en una diversidad de formatos diferentes, similares a los formatos que se usan en inmunoensayos y ensayos de unión de receptor. Para una descripción de diferentes formatos para ensayos de unión, que incluyen ensayos de unión competitivos y ensayos de unión directos, véanse *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition (D. Stites and A. Terr ed.) 1991; *Enzyme Immunoassay*, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1980); y "Practices and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985).

En ensayos de unión competitivos, por ejemplo, el compuesto de muestra puede competir con un analito marcado respecto a sitios específicos de unión sobre un agente de unión que está unido a una superficie sólida. En este tipo de formato el analito marcado puede ser 312C2 marcada y el agente de unión puede ser un anticuerpo unido a una fase sólida. Alternativamente, el analito marcado puede ser anticuerpo marcado y el agente de unión puede ser una 312C2 de tipo natural en fase sólida o un fragmento de la misma. La concentración de analito marcado unido al agente de captura es inversamente proporcional a la capacidad de un compuesto de prueba para competir en el ensayo de unión. La cantidad de inhibición de analito marcado por el compuesto de prueba depende de las condiciones del ensayo de unión y de las concentraciones de agente de unión, analito marcado, y compuesto de prueba que se usen. Bajo condiciones de ensayo especificadas, se dice que un compuesto es capaz de inhibir la unión de 312C2 a un anticuerpo específico en un ensayo de unión competitivo, si la cantidad de unión del analito marcado con el agente de unión se hace descender un 50% o preferiblemente un 90% o más. Cuando se usa un formato de ensayo de unión directo se dice que un compuesto de prueba se une a 312C2 cuando la señal medida es dos veces el nivel de fondo o más alta.

En un ensayo de unión competitivo, el compuesto de muestra compete con proteína marcada por la unión a un agente de unión específico. Según se ha descrito anteriormente, el agente de unión puede estar unido a una superficie sólida para efectuar la separación de la proteína marcada unida de la proteína marcada no unida. Alternativamente, el ensayo de unión competitivo puede ser conducido en fase líquida, y se puede usar cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en el sector para separar la proteína marcada unida de la proteína marcada no unida. Después de la separación, se determina la cantidad de proteína marcada unida. La cantidad de proteína presente en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de unión de proteína marcada.

Alternativamente, se puede realizar un ensayo de unión homogéneo en el que no se necesita etapa de separación. En este tipo de ensayos de unión, el marcador sobre la proteína es alterado por la unión de la proteína con su agente de unión específico. Esta alteración en la proteína marcada da como resultado una disminución o un aumento de la señal emitida por el marcador, de modo que la medición del marcador al final del ensayo de unión permite la detección o cuantificación de la proteína.

Los formatos de ensayos de unión que se describen en este documento emplean componentes de ensayo marcados. El marcador puede estar en una diversidad de formas. El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo según procedimientos bien conocidos en la técnica. Se puede usar una amplia

diversidad de marcadores. El componente puede ser marcado mediante uno cualquiera de varios procedimientos. Tradicionalmente, se usa un marcador radiactivo que incorpora ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ó ^{32}P . Marcadores no radiactivos incluyen ligandos que unen a anticuerpos marcados, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, y anticuerpos que pueden servir como miembros pares de unión específicos para un ligando marcado. La elección de marcador depende de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el compuesto, requisitos de estabilidad, e instrumentación disponible. Para una revisión de diversos sistemas de marcación o producción de señales que se pueden usar, véase la patente de EE.UU. N° 4.391.904.

Alternativamente, se puede examinar un banco de expresiones respecto a unión específica a 312C2, por ejemplo, mediante clasificación celular u otro examen para detectar subpoblaciones que expresen un componente de unión de este tipo. Véase, por ejemplo, Ho, y col. (1993) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 90:11267-11271. Alternativamente, se puede usar un procedimiento de separación por cribado. Véase, por ejemplo, Seed and Aruffo (1987) *Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 84:3365-3369. También se puede aplicar un sistema de selección de dos híbridos haciendo constructos apropiados con las secuencias de 312C2 disponibles. Véase, por ejemplo, Fields and Song (1989) *Nature* 340:245-246.

El amplio alcance de esta invención se entiende de la mejor manera con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención a realizaciones específicas.

Ejemplos

Procedimientos generales

Algunos de los procedimientos generales están descritos o referenciados, por ejemplo, en Maniatis, y col. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook, y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), vos 1-3. CSH Press, NY; Ausubel, y col., *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel, y col. (1987 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene and Wiley, Nueva York; Innis, y col. (eds.) (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, N.Y. Procedimientos para purificación de proteínas incluyen procedimientos tales como precipitación con sulfato amónico, cromatografía de columna, electroforesis, centrifugación, cristalización, y otros. Véanse, por ejemplo, Ausubel, y col. (1987 y suplementos periódicos); Deutscher "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* vol. 182, y otros volúmenes de esta serie; y bibliografía de fabricantes sobre uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos apropiados, por ejemplo a una secuencia FLAG o una equivalente que se pueda fusionar por la vía de una secuencia removible por proteasa. Véase, por ejemplo, Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering Principles and Methods* 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe, y col. (1992) *OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA. Técnicas de cultivo celular se describen en Doyle, y col. (eds.) (1994) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons, NY.

Se describen técnicas inmunológicas estándar, por ejemplo, en Herzenberg, y col. (eds. 1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology* vols 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; y *Methods in Enzymology* volúmenes 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, y 163.

Ensayos respecto a actividades biológicas vasculares son bien conocidos en la técnica. Cubrirán actividades angiogénicas y angiostáticas en tejidos de tumor y otros, por ejemplo, proliferación de músculo liso arterial (véase, por ejemplo, Koyoma, y col. (1996) *Cell* 87:1069-1078), adhesión de monocito a epitelio vascular (véase McEvoy, y col. (1997) *J. Exp. Med.* 185:2069-2077), etc. Véanse también Ross (1993) *Nature* 362:801-809; Reikter and Gordon (1995) *Am. J. Pathol.* 147:668-677; Thyberg, y col. (1990) *Atherosclerosis* 10:966-990; y Gumbiner (1996) *Cell* 84:345-357.

Ensayos respecto a actividades biológicas de células neurales se describen, por ejemplo, en Wouterlood (ed. 1995) *Neuroscience Protocols* modules 10, Elsevier; *Methods in Neuroscience* Academic Press; y *Neuromethods* Humana Press, Totowa, NJ. Metodología de sistemas de desarrollo se describe, por ejemplo, en Meisami (ed.) *Handbook of Human Growth and Development Biology* CRC Press; y Chrispeels (ed.) *Molecular Techniques and Approaches in Development Biology* Interscience.

Análisis FACS se describen en Melamed, y col. (1990) *Flow Cytometry and Sorting* Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry* Liss, Nueva York, NY; y Robinson, y col. (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods* Wiley-Liss, Nueva York, NY. La marcación fluorescente de reactivos apropiados se realizó mediante procedimientos estándar.

ES 2 308 787 T3

Ejemplo 1

Clonación de 312C2 de ratón

5 Anticuerpos y clasificación por citometría de flujo

Se clasificaron timocitos $\alpha\beta$ TcR+CD4-CD8- (DN) usando CD4/CD8a-PE y TcR $\alpha\beta$ -FITC mAbs (PharMingen, San Diego, CA). Véase Zlotnik, y col. (1992) *J. Immunol.* 4:1211-1215. Las células clasificadas (aproximadamente 5×10^5) se estimularon sobre anti-CD3 en fase sólida durante 24 h y a continuación se expandieron y cultivaron en IL-2 (500 U/ml) e IL-7 (100 U/ml) durante una semana (a aproximadamente 1×10^8 células). Las células o se recolectaron después de una semana de cultivo o se estimularon de nuevo durante 6 h sobre anti-CD3 y a continuación se recolectaron. Véase Kelner, y col. (1994) *Science* 266:1395-1399.

15 Construcción de bancos de ADNc direccional

Se usó poli (A) + ARN de timocitos $\alpha\beta$ DN estimulados con anti-CD3 o timocitos abDN no estimulados para sintetizar un primer filamento de ADNc usando iniciador NotI/Oligo-dT (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Se sintetizó ADNc de doble filamento, se ligó con adaptadores BstXI, se digirió con NotI, se fraccionó de tamaño para $>0,5$ kilopares de bases (kb) y se ligó en los sitios NotI/BstXI de pJFE-14, un derivado del vector pCDSR α . Véase Takebe, y col. *Mol. Cell Biol.* 8:466-472. Se usaron para la transformación células DH10 α de *E. coli* electro-competentes (Gibco-BRL). El número total de clones independientes de los bancos de ADNc fue $1,2 \times 10^6$ para timocitos $\alpha\beta$ DN estimulados y 8×10^5 para $\alpha\beta$ DN no estimulados, respectivamente.

25 Sustracción de banco

Se modificó el sistema de sustracción basado en PCR desarrollado por Wang y Brown (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88:11505-11509, para aplicarlo a bancos de ADNc plásmido. Se generó un banco de ADNc específico para timocitos $\alpha\beta$ DN activados usando 100 μ g de ADN del banco de ADNc $\alpha\beta$ DN no estimulado digerido con XbaI, NotI, y ScaI como ADN propulsor y 5 μ g de ADN del banco de ADNc $\alpha\beta$ DN estimulado como ADN trazador. Después de la digestión de restricción, el ADN propulsor se trató con fragmento de ADN polimerasa Klenow para rellenar los sitios de restricción. Después de precipitación con etanol, se disolvió el ADN en 100 μ l de agua, se desnaturalizó por calor y se mezcló con 100 μ l de biotina Fotosonda (Vector Laboratories, Burlingame, CA). El ADN propulsor se irradió a continuación con una lámpara solar de 270-W sobre hielo durante 20min. Se añadieron 50 μ l de biotina Fotosonda y se repitió la reacción de biotilación. Después de extracción con butanol, el ADN fotobiotinilado (propulsor- U) se precipitó con etanol y se disolvió en 30 μ l de Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8 (TE). Como ADN trazador, 5 μ l de ADNc $\alpha\beta$ DN estimulado fueron digeridos con XbaI y NotI; precipitados con etanol; y disueltos en 4 μ l de TE (trazador-S). El trazador-S se mezcló con 15 μ l de propulsor-U, 1 μ l (10 μ g) de ARNt de *E. coli* (Sigma St. Louis, MO), y 20 μ l de 2 x tampón de hibridación (NaCl 1,5 M, EDTA 10 mM, HEPES 50 nM, pH 7,5, SDS al 0,2%), cubierto con aceite mineral, se desnaturalizó por calor. El tubo de muestra se transfirió inmediatamente a un baño de agua a 68°C y se incubó durante 20 h. La mezcla de reacción se sometió a continuación a un tratamiento con estreptavidina seguido por extracción con fenol/cloroformo. Se precipitó ADN sustraído, se disolvió en 12 μ l de TE, se mezcló con 8 μ l de impulsor-U y 20 μ l de 2 x tampón de hibridación, y se incubó a continuación a 68°C durante 2 h. Después de tratamiento con estreptavidina el ADN restante se ligó con 250 ng de un fragmento de pJFE-14 purificado con XbaI/NotI y a continuación se transformó en células de *E. coli* electro-competentes para generar el banco sustraído de $\alpha\beta$ DN de activación específica (S1). Se escogieron aleatoriamente 100 clones independientes y se examinaron mediante hibridación usando un combinado de ADNc de citocina conocidos. Se prepararon ADN plásmidos de clones que no se hibridan con las sondas de citocina. Esos clones fueron agrupados por tamaño de inserción y posteriormente caracterizados por secuenciado de ADN. Se aislaron clones correspondientes a 312C2.

Ejemplo 2

Expresión celular de 312C2 de ratón

55 Se usó una sonda específica para ADNc que codificaba 312C2 de ratón para determinar la distribución del antígeno en el tejido. Todas las sondas se marcaron mediante imprimación aleatoria.

Los resultados mostraron que 312C2 se expresó lo más abundantemente en células T, en particular, en ciertos subconjuntos de células T activadas. Timo, bazo y nódulo linfático pareció que tenían más expresión que otros tejidos. Los niveles de expresión son: timo +; subconjunto Th1 ++++; subconjunto Th2 ++++, células T (NK1.1+) ++; células T $\alpha\beta$ ++; pro células T +; células (CD4+) ++; células (CD8+) ++; y células del bazo activadas +. También se detectó un mensaje en ciertas líneas celulares B pro-, pre- y maduras. La señal en los siguientes tipos de células sugirió que la expresión es muy baja a virtualmente ausente en pulmón, corazón, riñón, macrófago, estroma, cerebro, hígado, 65 músculo y testículos.

ES 2 308 787 T3

Ejemplo 3

Purificación de proteína 312C2

5 Se examinan líneas celulares transfectadas múltiples respecto a una que exprese el antígeno a un nivel alto en comparación con otras células. Se examinan diversas líneas celulares y se seleccionan respecto a sus propiedades favorables en el manejo. Se puede aislar 312C2 natural de fuentes naturales, o mediante expresión de una célula transformada usando un vector de expresión apropiado. La purificación de la proteína expresada se logra mediante procedimientos estándar o se puede combinar con medios de ingeniería para purificación eficaz con alta eficacia desde lisatos o materiales sobrenadantes celulares. Se pueden usar segmentos FLAG o His6 para perfiles de purificación de este tipo.

15 Mediante análisis de Northern, es claro que 312C2 se expresa en diversas células T, Th1, Th2, CD4+, CD8+, NK1.1+, pro-, pre, y $\alpha\beta$ CD4- CD8-. También se expresa 312C2 en timo y células activadas de bazo. Las células que expresan 312C2 contienen típicamente una transcripción de aproximadamente 1,3 kb, correspondiente al tamaño del ADNc de 312C2 clonado. No se han detectado transcripciones para 312C2 en tejido de corazón, riñón, macrófago, estroma, cerebro, hígado, músculo, testículos.

20 La homología estructural de 312C2 con la familia de receptores del TNF, sugiere una amplia función de esta molécula. 312C2, como molécula de activación, probablemente intermedia respuestas proliferativas mejoradas Ag-específicas sobre células T, o inducción de apoptosis de esas células. Agonistas de 312C2, o antagonistas, también pueden actuar como molécula coestimuladora para activación de células T, y de hecho pueden provocar un cambio de tipos de célula T auxiliar, por ejemplo, de Th1 a Th2, o de Th2 a Th1. Así, 312C2 puede ser útil en el tratamiento de trastornos inmunitarios anormales, por ejemplo, deficiencias inmunitarias de células T, inflamación crónica, o rechazo de tejido.

30 La proteína 312C2 de ratón exhibe perfiles estructurales característicos de un antígeno de la superficie celular. La proteína se detecta fácilmente sobre tipos de células particulares, otras expresan cantidades más pequeñas. El antígeno de 312C2 debería estar presente en los tipos de tejidos identificados y la interacción del antígeno con su compañero de unión debería ser importante para la intermediación de diversos aspectos de la fisiología o el desarrollo celular.

Ejemplo 4

Aislamiento de genes de 312C2 homólogos

35 Se puede usar ADNc de 312C2 como sonda de hibridación para examinar un banco de una fuente deseada, por ejemplo, un banco de ADNc de células de primate. Se pueden examinar muchas especies diferentes tanto respecto a la rigurosidad necesaria para una fácil hibridación, como respecto a presencia usando una sonda. Se usarán condiciones de hibridación apropiadas para seleccionar clones que exhiban especificidad a la hibridación cruzada. Específicamente, se usó el clon de ADNc de 312C2 de ratón para sondear el banco de células T anérgicas humanas HY06. Se aisló un clon de aproximadamente 1006 pb que codifica un polipéptido previsto de 241 aminoácidos.

45 El examen mediante hibridación usando sondas degeneradas basadas en secuencias de péptido también permitirá el aislamiento de clones apropiados. Alternativamente, el uso de iniciadores apropiados para examen por PCR producirá enriquecimiento de clones de ácido nucleico apropiados.

50 Procedimientos similares son aplicables para aislar variantes tanto de especies, como polimórficas, o alélicas. Se aíslan variantes de especies usando técnicas de hibridación cruzada de especies basadas en el aislamiento de un aislado de longitud completa o un fragmento de una de las especies como sonda.

55 Alternativamente, se usarán anticuerpos desarrollados contra 312C2 de ratón para examinar las células que expresen proteínas reactivas al cruce de un banco apropiado, por ejemplo de ADNc. La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos mediante procedimientos estándar, según se describe anteriormente. Se presentan péptidos sintéticos o proteína purificada a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Los anticuerpos resultantes se usan para examen, separación por cribado o clasificación.

Ejemplo 5

Expresión y distribución en tejido de 312C2 humana

65 Se realizaron análisis de Southern y PCR de células y tejidos hematopoyéticos diversos según se describe anteriormente. Se detectó expresión en varias líneas celulares y tejidos, las más notables, banco de células dendríticas estimuladas, algunos clones de células T activadas, PBMCs activados, clones NK, células Th1, Th2, pre-células T, pro-células T. Tejidos de bazo y pulmón tuvieron niveles detectables de 312C2.

Ejemplo 6

Preparación de anticuerpos específicos para 312C2

5 Se presentaron péptidos sintéticos y proteínas purificadas a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales Véanse, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow and Lane (1989) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Se pueden preparar suero policlonal o hibridomas. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión o bien se marca como se describe anteriormente, por ejemplo, por fluorescencia o de otra manera, o se inmoviliza sobre un sustrato para procedimientos de separación por cribado.

10 Las realizaciones específicas anteriormente descritas se ofrecen solamente a modo de ejemplo, y la invención se ha de limitar solamente por los términos de las reivindicaciones que se adjuntan, junto con el alcance completo de términos equivalentes a los que tales reivindicaciones sean acreedoras.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 787 T3

REIVINDICACIONES

- 5 4. 1. Un polipéptido antigénico que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4.
2. Una proteína aislada o recombinante que comprende la secuencia de polipéptido definida por SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4.
- 10 3. La proteína de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
4. La proteína de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4.
- 15 5. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a antígeno que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 1 y es específicamente inmunorreactivo con la proteína de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, que es un anticuerpo monoclonal.
7. El anticuerpo de la reivindicación 5, que es un anticuerpo humanizado.
- 20 8. El fragmento que se une a antígeno de la reivindicación 5, en el que el fragmento es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab)₂, o un fragmento Fv.
9. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la reivindicación 5 y uno o más vehículos aceptables.
- 25 10. Un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un polipéptido antigénico que comprende al menos 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4.
- 30 11. Un ácido nucleico de la reivindicación 10, que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
12. El ácido nucleico de la reivindicación 10 que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4.
- 35 13. El ácido nucleico de la reivindicación 11 que tiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 1.
14. El ácido nucleico de la reivindicación 12 que tiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 3.
- 40 15. Un vector de expresión o replicación que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 10.
16. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 15.
- 45 17. Un procedimiento para preparar una proteína que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 16 bajo condiciones en las que se expresa el ácido nucleico.
18. Un procedimiento para modular la fisiología de una célula *in vitro* que comprende poner en contacto dicha célula con:
- 50 a) una proteína aislada o recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 ó un polipéptido antigénico que comprende al menos aproximadamente 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4; o
- 55 b) un anticuerpo o composición de unión que específicamente se une a una proteína recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 ó a un polipéptido antigénico que comprende al menos aproximadamente 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 y es específicamente inmunorreactivo con la proteína de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4; o
- 60 c) un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 ó un polipéptido antigénico que comprende al menos aproximadamente 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha célula es una célula T.
20. Un procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicha célula es un tejido.
- 65 21. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a antígeno que se une específicamente a una proteína aislada o recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 y es específicamente inmunorreactivo con la

ES 2 308 787 T3

proteína de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

5 22. Uso del anticuerpo de la reivindicación 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

10 23. Uso de una proteína recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

24. Uso de un polipéptido antigénico que comprende al menos aproximadamente 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

15 25. Uso de un ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

20 26. Uso de un ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico que comprende al menos aproximadamente 12 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de proliferación anormal, dolencias cancerosas, dolencias degenerativas, o trastornos autoinmunitarios en un mamífero.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 787 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Schering Corporation
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Antígenos de superficie celular de mamíferos; Reactivos relacionados
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 5
- 10 (iv) DIRECCIÓN POSTAL
- (A) DESTINATARIO: Schering-Plough Corporation
- (B) CALLE: 2000 Galloping Hill Road K-6-1 1990
- 15 (C) CIUDAD: Kenilworth
- (D) ESTADO: New Jersey
- (E) NACIÓN: EE.UU.
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 07033
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Publicación #1.0, Versión #1.30
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE LA PRIMERA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/689943
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16 AGOSTO 1996
- 40 (viii) INFORMACIÓN DE PROCURADOR/AGENTE
- (A) NOMBRE: Cyntia L. Foulke
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32364
- 45 (C) REFERENCIA/NÚMERO DOCKET: DX0612K
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: (908) 298-2987
- 50 (B) TELEFAX: (908) 298-5388
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 1073 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
- 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (ix) PERFIL:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) SITUACIÓN 68..754
- (D) OTRA INFORMACIÓN:

ES 2 308 787 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

5	CTCGAGATCC ATTGTGCTGG AAAGGGAAct CCTGAAATCA GCCGACAGAA GACTCAGGAG	60
	AAGCACT ATG GGG GCA TGG GCC ATG CTG TAT GGA GTC TCG ATG CTC TGT	109
	Met Gly Ala Trp Ala Met Leu Tyr Gly Val Ser Met Leu Cys	
	1 5 10	
10	GTG CTG GAC CTA GGT CAG CCG AGT GTA GTT GAG GAG CCT GGC TGT GGC	157
	Val Leu Asp Leu Gly Gln Pro Ser Val Val Glu Glu Pro Gly Cys Gly	
	15 20 25 30	
15	CCT GGC AAG GTT CAG AAC GGA AGT GGC AAC AAC ACT CGC TGC TGC AGC	205
	Pro Gly Lys Val Gln Asn Gly Ser Gly Asn Asn Thr Arg Cys Cys Ser	
	35 40 45	
20	CTG TAT GCT CCA GGC AAG GAG GAC TGT CCA AAA GAA AGG TGC ATA TGT	253
	Leu Tyr Ala Pro Gly Lys Glu Asp Cys Pro Lys Glu Arg Cys Ile Cys	
	50 55 60	
25	GTC ACA CCT GAG TAC CAC TGT GGA GAC CCT CAG TGC AAG ATC TGC AAG	301
	Val Thr Pro Glu Tyr His Cys Gly Asp Pro Gln Cys Lys Ile Cys Lys	
	65 70 75	
30	CAC TAC CCC TGC CAA CCA GGC CAG AGG GTG GAG TCT CAA GGG GAT ATT	349
	His Tyr Pro Cys Gln Pro Gly Gln Arg Val Glu Ser Gln Gly Asp Ile	
	80 85 90	
35	GTG TTT GGC TTC CGG TGT GTT GCC TGT GCC ATG GGC ACC TTC TCC GCA	397
	Val Phe Gly Phe Arg Cys Val Ala Cys Ala Met Gly Thr Phe Ser Ala	
	95 100 105 110	
40	GGT CGT GAC GGT CAC TGC AGA CTT TGG ACC AAC TGT TCT CAG TTT GGA	445
	Gly Arg Asp Gly His Cys Arg Leu Trp Thr Asn Cys Ser Gln Phe Gly	
	115 120 125	
45	TTT CTC ACC ATG TTC CCT GGG AAC AAG ACC CAC AAT GCT GTG TGC ATC	493
	Phe Leu Thr Met Phe Pro Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Ile	
	130 135 140	
50	CCG GAG CCA CTG CCC ACT GAG CAA TAC GGC CAT TTG ACT GTC ATC TTC	541
	Pro Glu Pro Leu Pro Thr Glu Gln Tyr Gly His Leu Thr Val Ile Phe	
	145 150 155	
55	CTG GTC ATG GCT GCA TGC ATT TTC TTC CTA ACC ACA GTC CAG CTC GGC	589
	Leu Val Met ala Ala Cys Ile Phe Phe Leu Thr Thr Val Gln Leu Gly	
	160 165 170	
60	CTG CAC ATA TGG CAG CTG AGG AGG CAA CAC ATG TGT CCC CGA GAG ACC	637
	Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Arg Gln His Met Cys Pro Arg Glu Thr	
	175 180 185 190	
65	CAG CCA TTC GCG GAG GTG CAG TTG TCA GCT GAG GAT GCT TGC AGC TTC	685
	Gln Pro Phe Ala Glu Val Gln Leu Ser Ala Glu Asp Ala Cys Ser Phe	
	195 200 205	
70	CAG TTC CCT GAG GAG GAA CGC GGG GAG CAG ACA GAA GAA AAG TGT CAT	733
	Gln Phe Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Gln Thr Glu Glu Lys Cys His	
	210 215 220	

ES 2 308 787 T3

CTG GGG GGT CGG TGG CCA TGAGGCCTGG TCTTCCTCTG TGCCCCAAGC 781
 Leu Gly Gly Arg Trp Pro
 225
 CAGACGCTAC AAGACTTGCC CAGCTATAACC CTTGGTGAGA GCAGGGGCCA TGCTCTGCAC 841
 CCTTCCCTGG GCCTGGCCCT GCTCCCCTCA ACAGTGGCGG AAGTGGGTGT ATGAGAGCGG 901
 TGAGTTACGA TTGGGCCCTA TGGCTGCCTT TCTCATTGA CAGCTCTGTT GGAGTAGGGT 961
 CTTTGGGCCC ACCAAGAGCA CCACGTTTGT CACAAGATCT TGTACAAGAA TAAATACTTG 1021
 TTTAGTAACC TGAAAAAAAA AAAAAAAGG GCGGCCGCGG AGGCCGAATT CC 1073

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 228 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

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

ES 2 308 787 T3

Phe Ala Glu Val Gln Leu Ser Ala Glu Asp Ala Cys Ser Phe Gln Phe
195 200 205

Pro Glu Glu Glu Arg Gly Glu Gln Thr Glu Glu Lys Cys His Leu Gly
210 215 220

Gly Arg Trp Pro
225

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1006 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) PERFIL:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) SITUACIÓN 1..723

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

35	ATG GCA CAG CAC GGG GCG ATG GGC GCG TTT CGG GCC CTG TGC GGC CTG Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu 1 5 10 15	48
40	GCG CTG CTG TGC GCG CTC AGC CTG GGT CAG CGC CCC ACC GGG GGT CCC Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro 20 25 30	96
45	GGG TGC GGC CCT GGG CGC CTC CTG CTT GGG ACG GGA ACG GAC GCG CGC Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg 35 40 45	144
50	TGC TGC CGG GTT CAC ACG ACG CGC TGC TGC CGC GAT TAC CCG GGC GAG Cys Cys Arg Val His Thr Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu 50 55 60	192
55	GAG TGC TGT TCC GAG TGG GAC TGC ATG TGT GTC CAG CCT GAA TTC CAC Glu Cys Cys Ser Glu Trp Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His 65 70 75 80	240
60	TGC GGA GAC CCT TGC TGC ACG ACC TGC CGG CAC CAC CCT TGT CCC CCA Cys Gly Asp Pro Cys Cys Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro 85 90 95	288
65	GGC CAG GGG GTA CAG TCC CAG GGG AAA TTC AGT TTT GGC TTC CAG TGT Gly Gln Gly Val Gln Ser Gln Gly Lys Phe Ser Phe Gly Phe Gln Cys 100 105 110	336
65	ATC GAC TGT GCC TCG GGG ACC TTC TCC GGG GGC CAC GAA GGC CAC TGC Ile Asp Cys Ala Ser Gly Thr Phe Ser Gly Gly His Glu Gly His Cys 115 120 125	384

ES 2 308 787 T3

5	AAA CCT TGG ACA GAC TGC ACC CAG TTC GGG TTT CTC ACT GTG TTC CCT Lys Pro Trp Thr Asp Cys Thr Gln Phe Gly Phe Leu Thr Val Phe Pro 130 135 140	432
10	GGG AAC AAG ACC CAC AAC GCT GTG TGC GTC CCA GGG TCC CCG CCG GCA Gly Asn Lys Thr His Asn Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala 145 150 155 160	480
15	GAG CCG CTT GGG TGG CTG ACC GTC GTC CTC CTG GCC GTG GCC GCC TGC Glu Pro Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys 165 170 175	528
20	GTC CTC CTC CTG ACC TCG GCC CAG CTT GGA CTG CAC ATC TGG CAG CTG Val Leu Leu Leu Thr Ser Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu 180 185 190	576
25	AGG AGT CAG TGC ATG TGG CCC CGA GAG ACC CAG CTG CTG CTG GAG GTG Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro Arg Glu Thr Gln Leu Leu Leu Glu Val 195 200 205	624
30	CCG CCG TCG ACC GAA GAC GCC AGA AGC TGC CAG TTC CCC GAG GAA GAG Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu Glu Glu 210 215 220	672
35	CGG GGC GAG CGA TCG GCA GAG GAG AAG GGG CCG CTG GGA GAC CTG TGG Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp 225 230 235 240	720
40	GTG TGAGCCTGGC CGTCCTCCGG GGCCACCGAC CGCAGCCAGC CCCTCCCCAG Val	773
45	GAGCTCCCCA GGCCGCAGGG GCTCTGCGTT CTGCTCTGGG CCGGGCCCTG CTCCCCTGGC	833
50	AGCAGAAGTG GGTGCAGGAA GGTGGCAGTG ACCAGCGCCC TGGACCATGC AGTTCGGCGG	893
55	CCGCTCTAAA GGATCCAAGC TTACGTACGC GTGCATGCGA CGTCATAGCT CTTCTATAGT	953
60	GTCACCTAAA TTCAATTCAC TGGCCGTCGT TTTACAACGT CCTGACTGGG AAA	1006

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 241 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

60	Met Ala Gln His Gly Ala Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu 1 5 10 15
65	Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro 20 25 30
70	Gly Cys Gly Pro Gly Arg Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg 35 40 45

ES 2 308 787 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 723 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

ATGGCNCARC AYGGNGCNAT GGGNGCNTTY MGNGCNYTNT GYGGNYTNGC NYTNYTNTGY 60
 GCNYTNWSNY TNGGNCARMG NCCNACNGGN GGNCNGGNT GYGGNCCNGG NMGNYTNYTN 120
 YTNGGNACNG GNACNGAYGC NMGNTGYTGY MGNGTNCAYA CNACNMGNTG YTYMGNGAY 180

ES 2 308 787 T3

TAYCCNGGNG ARGARTGYTG YWSNGARTGG GAYTGYATGT GYGTNCARCC NGARTTYCAY 240
 TGYGGNGAYC CNTGYTGYAC NACNTGYMGN CAYCAYCCNT GYCCNCCNGG NCARGGNGTN 300
 5 CARWSNCARG GNAARTTYWS NTTYGGNTTY CARTGYATHG AYTGYGCNWS NNGNACNTTY 360
 WSNCGNGGNC AYGARGGNC YTGAAARCCN TGGACNGAYT GYACNCARTT YGNTTYTYTN 420
 10 ACNGTNTTYC CNGGNAAYAA RACNCAYAA YGNGTNTGYG TNCCNGGNS NCCNCCNGCN 480
 GARCCNYTNG GNTGGYTNAC NGTNGTNYTN YTNCGNGTNG CNGCNTGYGT NYTNYTNYTN 540
 ACNWSNGCNC ARYTNGGNYT NCAATHHTGG CARYTNMGNW SNCARTGYAT GTGGCCNMGN 600
 15 GARACNCARY TNYTNYTNGA RGTNCCNCCN WSNACNGARG AYGCMGNWS NTGYCARTTY 660
 CCNGARGARG ARMGNGGNGA RMGNWSNGCN GARGARAARG GNMGNNTNGG NGAYTNTGG 720
 20 GTN 723

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 228 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

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

ES 2 308 787 T3

Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala Glu Pro Leu Gly Trp Leu
 145 150 155 160

5 Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val Leu Leu Leu Thr Ser
 165 170 175

Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Lys Thr Gln Leu Leu
 180 185 190

10 Leu Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro
 195 200 205

15 Glu Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly
 210 215 220

Asp Leu Trp Val
 225

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 232 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 30 (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

40 Met Gly Ala Phe Arg Ala Leu Cys Gly Leu Ala Leu Leu Cys Ala Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Gln Arg Pro Thr Gly Gly Pro Gly Cys Gly Pro Gly Arg
 20 25 30

45 Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Asp Ala Arg Cys Cys Arg Val His Thr
 35 40 45

50 Thr Arg Cys Cys Arg Asp Tyr Pro Gly Glu Glu Cys Cys Ser Glu Trp
 50 55 60

Asp Cys Met Cys Val Gln Pro Glu Phe His Cys Gly Asp Pro Cys Cys
 65 70 75 80

55 Thr Thr Cys Arg His His Pro Cys Pro Pro Gly Gln Gly Val Gln Ser
 85 90 95

60 Gln Gly Lys Ser Trp Arg Cys Leu Trp Glu Ser Thr Gln Ala Arg Gly
 100 105 110

Ser Thr Arg Ala Arg Gly Arg Ala Arg Gly His Arg Cys Pro Ala Arg
 115 120 125

65 Thr Cys Gly Val Trp Gly Pro Glu Ser Cys Glu Ala Gly Gln Ala Arg
 130 135 140

ES 2 308 787 T3

Pro Cys Ser Gly Thr Thr Gly His Glu Ala Leu Gly Val Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 5 Cys Phe Leu Ser Leu Gly Phe Ser Ile Gln His Glu Gly Cys Glu Asn
 165 170 175
 Pro Ala Gly Arg Trp Gly Arg Val Pro Gly Ala Val Trp Leu Ser Gly
 180 185 190
 10 Pro Gly His Pro Ser Cys Leu Ser Ser Pro His Thr Glu Arg Ala Cys
 195 200 205
 15 Pro Val Pro Pro Gly Val Leu Ser Gly Ala Trp Gly Cys Thr Leu Phe
 210 215 220
 Trp Lys Glu Gln Leu Lys Ser Ser
 225 230

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 311 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 30 (C) CLASE DE FILAMENTO: sencillo
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

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

ES 2 308 787 T3

Ala Val Cys Val Pro Gly Ser Pro Pro Ala Glu Pro Leu Gly Trp Leu
 145 150 155 160

5 Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val Leu Leu Leu Thr Ser
 165 170 175

Ala Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp
 180 185 190

10 Pro Arg Gly Leu Ser Gln Pro Gly Ala Gly Arg Trp Glu His Gly Cys
 195 200 205

15 Leu Leu Thr Val Ala Pro Leu Gln Arg Pro Ser Cys Cys Trp Arg Cys
 210 215 220

Arg Arg Arg Pro Lys Thr Pro Glu Ala Ala Ser Ser Pro Arg Lys Ser
 225 230 235 240

20 Gly Ala Ser Asp Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Trp Glu Thr Cys Gly
 245 250 255

25 Cys Glu Pro Gly Arg Pro Pro Gly Pro Pro Thr Ala Ala Ser Pro Ser
 260 265 270

Pro Gly Ala Pro Gln Ala Ala Gly Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Arg
 275 280 285

30 Ala Leu Leu Pro Trp Gln Gln Lys Trp Val Gln Glu Gly Gly Ser Asp
 290 295 300

35 Gln Arg Pro Gly Pro Cys Ser
 305 310

35
40
45
50
55
60
65