



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 312**

51 Int. Cl.:

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07002409 .6**

96 Fecha de presentación : **27.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1806404**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Uso de anticuerpos antagonistas del receptor de IL-10 para inhibir la inducción por IL-TIF/IL-21 de proteínas de fase aguda.**

30 Prioridad: **27.07.2000 US 626617**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.12.2010

73 Titular/es: **WYETH L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es: **Renauld, Jean-Christophe y**
Dumoutier, Laure

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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**CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista de IL10R β en la inhibición de la inducción de una respuesta de fase aguda mediante IL-5 TIF/IL-21.

[0002] También se describen moléculas de ácidos nucleicos recién aisladas y sus usos. Se ha demostrado que las moléculas de ácidos nucleicos están reguladas en exceso por la citocina interleucina-9 ("IL-9"). Además se describen las proteínas codificadas por las anteriores. Estas moléculas se han descrito como "factores 10 inducibles derivados de células T" o "TIF"; no obstante, desde ahora, se conocen como "interleucina 21" o "IL-21", así como "IL-TIF". Por esta razón, en el presente documento los términos se usarán de manera intercambiable. Estas moléculas de ácidos nucleicos codifican proteínas que inducen la activación de STAT en las células. Se pueden usar, por ejemplo, en la estimulación de la regeneración de tejidos diana. 15 Además, se pueden usar sus inhibidores o antagonistas para retrasar, evitar o inhibir la diferenciación de otros tejidos.

ANTECEDENTES Y TÉCNICA ANTERIOR

[0003] La última década ha visto como se ha expandido tremendamente el conocimiento del sistema inmunitario y su regulación. Un área de interés particular ha 20 sido la investigación de las proteínas y glicoproteínas que regulan el sistema inmunitario. Una de las familias de estas moléculas mejor conocidas son las citocinas. Se trata de moléculas que están involucradas en la "comunicación" de las células entre sí. Se ha encontrado que miembros individuales de la familia de las citocinas están involucrados en una amplia variedad de dolencias patológicas, tales como el cáncer y 25 las alergias. Aunque algunas veces las citocinas están involucradas en la patología de la dolencia, también se sabe que son terapéuticamente útiles.

[0004] Las interleucinas son un tipo de citocina. La bibliografía sobre interleucinas es vasta. Un listado a modo de ejemplo, pero de ningún modo exhaustivo, de las patentes en este área incluyen la patente de EE.UU. N° 4.778.879 de 30 Mertelsmann y col.; patente de EE.UU. N° 4.490.289 de Stern; patente de EE.UU. N° 4.518.584 de Mark y col.; y patente de EE.UU. N° 4.851.512 de Miyaji y col., todas ellas que se refieren a la interleucina-2 o "IL-2". Se han expedido patentes adicionales que se refieren a la interleucina-1 ("IL-1"), tales como la patente de EE.UU. N° 4.808.611 de Cosman. La descripción de todas estas patentes se incorpora al presente 35 documento por referencia. Patentes más recientes sobre interleucinas diferentes

incluyen las patentes de EE.UU. N° 5.694.234 (IL-13); 5.650.492 (IL-12); 5.700.664, 5.371.193 y 5.215.895 (IL-11); 5.728.377, 5.710.251, 5.328.989 (IL-10); 5.580.753, 5.587.302, 5.157.112, 5.208.218 (IL-9); 5.194.375, 4.965.195 (IL-7); 5.723.120, 5.178.856 (IL-6), y 5.017.691 (IL-4). Incluso una revisión somera de esta bibliografía de patentes muestra la diversidad de las propiedades de los miembros de la familia de la interleucina. Se puede asumir que la gran familia de citocinas muestra una diversidad incluso superior. Véase, por ejemplo, Aggarwal y col., ed., Human Cytokines: Handbook For Basic And Clinical Research (Blackwell Scientific Publications, 1992), Paul, ed., Fundamental Immunology (Raven Press, 1993), pg 763-836, "T-Cell Derived Cytokines And Their Receptors", y "Proinflammatory Cytokines and Immunity".

[0005] Las relaciones entre las diversas citocinas son complejas. Como se puede observar de las referencias citadas en el presente documento, a medida que se incrementa o se reduce el nivel de una citocina particular, esto puede afectar a los niveles de otras moléculas producidas por un sujeto, ya sea directa o indirectamente. Entre las moléculas afectadas están otras citocinas.

[0006] La linfoquina IL-9, denominada previamente "P40", es una molécula derivada de células T que se identificó originalmente como un factor que sostiene un crecimiento permanente independiente de antígenos de líneas celulares de T4. Véase, por ejemplo, Uyttenhove y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 6934 (1988), y Van Snick y col., J. Exp. Med. 169: 363 (1989) y Simpson y col., Eur. J. Biochem. 183: 715 (1989).

[0007] La actividad de IL-9 se observó por primera vez sobre líneas celulares de T4 restringidas, que no muestran actividad sobre CTL o células T recién aisladas. Véanse, por ejemplo, Uyttenhove y col., anteriormente, y Schmitt y col., Eur. J. Immunol. 19: 2167 (1989). Este intervalo de actividad se expandió cuando los experimentos demostraron que la IL-9 y la molécula denominada factor III de crecimiento de células T ("TCGF III") eran idénticas a la MEA (actividad que aumenta el crecimiento de mastocitos), un factor que potencia la respuesta proliferativa de mastocitos derivados de médula ósea a IL-3, como describe en Hültner y col., Eur. J. Immunol. y en la patente de EE.UU. N° 5.164.317. También se encontró que la forma humana de la IL-9 estimula la proliferación de la leucemia megacarioblástica. Véase Yang y col., Blood 74: 1880 (1989). El trabajo sobre la IL-9 ha demostrado que también ayuda en la formación de colonias eritroides (Donahue y col., Blood 75(12): 2271-2275 (6-15-90)); promueve la proliferación de la formación de eritroides y mieloides (Williams y col., Blood 76: 306-311 (9-1-90); y ayuda en la maduración de

clones de BFU-E de origen adulto y fetal (Holbrook y col., Blood 77(10): 2129-2134 (5-15-91)). La expresión de IL-9 se ha relacionado con la enfermedad de Hodgkins y con el linfoma anaplásico de células grandes (Merz y col., Blood 78(8): 1311-1317 (9-1-90)). Los análisis genéticos de ratones que eran susceptibles o resistentes al desarrollo de hiperrespuesta bronquial han desentrañado en este modelo una relación con el gen IL-9, así como una correlación entre la producción de IL-9 y la susceptibilidad (Nicolaidis y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13175-13180, 1997). Los estudios genéticos en seres humanos también apuntan a los genes IL-9 y IL-9R como candidatos para el asma (Doull y col., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 153, 1280-1284, 1996; Holroyd y col., Genomics 52, 233-235, 1998). Además, los ratones transgénicos en IL-9 permitieron la demostración de que un aumento en la expresión de IL-9 daba como resultado mastocitosis pulmonar, hipereosinofilia, hiperrespuesta bronquial y niveles elevados de IgE (Temann y col., J. Exp. Med. 188, 1307-1320, 1998; Godfraind y col., J. Immunol. 160, 3989-3996, 1998; McLane y col., Am. J. Resp. Cell. Mol. 19:713-720 (1999)). Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren poderosamente que la IL-9 desempeña un papel importante en esta enfermedad. Trabajos adicionales han implicado la IL-9 y muteínas de esta citocina en el asma y alergias. Véase, por ejemplo, los documentos WO 97/08321 (Levitt, y col.), y WO 98/24904 (Levitt, y col.).

[0008] Se sabe que la IL-9 afecta a los niveles de otras moléculas en sujetos. Véanse, Louahed y col., J. Immunol. 154: 5061-5070 (1995); Demoulin y col., Mol. Cell. Biol. 16: 4710-4716 (1996). Se reconocerá que las moléculas afectadas tienen sus propias funciones en sistemas biológicos. Por ejemplo, Demoulin y col. demuestran que muchas de las actividades conocidas de la IL-9 están mediadas por la activación de factores de transcripción STAT. Como tal, hay un interés continuo en intentar identificar moléculas cuya presencia y/o niveles se vean afectado por otras moléculas, tales como las citocinas.

[0009] La siguiente descripción describe esas moléculas. Se encontró que moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención se expresaban en presencia de IL-9, pero no en su ausencia. Por tanto, esas moléculas son, entre otros, "marcadores" de la expresión o el efecto de la IL-9 en un sujeto. Estas moléculas denominadas anteriormente factores inducibles derivados de células T o "TIF" ahora se denominan interleucina-21, o "IL-21". Éstas y otras características de la invención se apreciarán con la siguiente descripción.

El documento WO 00/24578 describe el aislamiento de moléculas de ácidos nucleicos

descritas como factores inducibles derivados de células T (TIF) que están reguladas en exceso por la IL-9 y que inducen la activación de STAT en células.

Dumoutier y col., J. Immunology (2000) 164:1814-1819 describen la clonación y caracterización de IL-TIF y demuestran que esto está inducido por la IL-9 en linfomas 5 tímicos, células T y mastocitos y por lectinas en esplenocitos recién aislados. La proteína muestra una identidad en aminoácidos del 22% con la IL-10.

El documento US 5.843.697 describe la preparación de células recombinantes que expresan el receptor de IL-10 y una proteína de transducción de señales de IL-10 recién identificada, CRFB4, que junto con IL-10R forma un complejo receptor de IL- 10 funcional. También se describe el uso de agonistas o antagonistas de IL-10.

Kotenko y col., EMBO J. (1997) 16(19):5894-5903 describen la identificación y caracterización funcional de la cadena CRFB4 del receptor de IL-10.

Gabay y col., New England J. Med. (1999) 340(6):448-454 revisan el estado de la técnica en lo que se refiere a la respuesta de fase aguda y describe que esto se 15 manifiesta, en parte, por una producción incrementada de las proteínas de fase aguda.

Lacki y col., Archivum Immunologiae et Therapiac Experimentalis (1995) 43:11-14 describen una investigación del efecto de la IL-10 sobre la respuesta de fase aguda y propone que la IL-10 puede reducir la producción de IL-6 y con ello se puede afectar indirectamente la respuesta de fase aguda en pacientes RA.

20 DiSanto y col., Neuroimmunomodulation (1995) 2:149-154 describen la inhibición por IL-10 de la producción de TNF inducida por LPS *in vivo* e *in vitro*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Ejemplo 1

[0010] La línea celular de linfoma murino BW5147 es una línea celular muy 25 conocida que puede crecer *in vitro*, sin necesidad de añadir ninguna citocina a su medio de cultivo. Para identificar genes inducidos por la IL-9, se cultivaron muestras de BW5147 con 200 U/ml, o sin IL-9, durante 24 horas. A continuación, se aisló el ARN total, usando lisis con isotiocianato de guanidina, y centrifugación en gradiente de CsCl. Estas técnicas son muy conocidas en la materia. Después de esto, el ARN 30 poliadenilado se purificó a partir del ARN total, usando una columna de oligo(dT) celulosa. El ARN poliA aislado, se usó a continuación para generar un ADNc bicatenario. Se usó un cebador oligo(dT) disponible comercialmente. Se calentaron entre 3-5 µg de ARN poliA a 70°C durante 10 minutos con 1 µg de oligo(dT), y a continuación se incubaron con tampón de primera cadena 5x (HCl 250 mM (pH 8,3), 35 KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), ditiotretitol 10 mM, 500 µM de desoxinucleótidos

trifosfatos, y 800 U de transcriptasa inversa. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 20 µl, y la reacción se dejó proseguir a 37°C durante una hora. Esto dio como resultado la síntesis de la primera cadena de ADNc. La síntesis de la segunda cadena se consiguió con la adición de 30 µl de tampón de la segunda cadena 5x (Tris-HCl 100 mM (pH 6,9)), KCl 450 mM, MgCl₂ 23 mM, β-NAD⁺ 0,75 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, junto con 60 U de ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, 2U de RNasa H de *E. coli*, 10 U de ADN ligasa de *E. coli*, y 250 µM de desoxinucleótidos trifosfatos, y se llevó hasta un volumen final de 150 µl. La mezcla se incubó durante dos horas, a 16°C.

[0011] El producto se extrajo usando fenol-cloroformo, y se precipitó con etanol.

10 El producto de ADNc final a continuación se resuspendió en 200 µl de TE.

[0012] Estas etapas se llevaron a cabo tanto en las células BW5147 estimuladas (en adelante "probadora"), y para células BW5147 en paralelo sin estimular (en adelante "conductora").

Ejemplo 2

15 **[0013]** El ADNc preparado en el Ejemplo 1 a continuación se sometió a clonación por sustracción de acuerdo con procedimientos muy conocidos. Para hacer esto, se prepararon seis oligonucleótidos:

5'-AGCACTCTCC AGCCTCTCAC CGCA-3 (SEC ID N°: 1);

5'-GATCTGCGGT GA-3' (SEC ID N°: 2);

20 5'-ACCGACGTCG ACTATCCATG AACA-3' (SEC ID N°: 3);

5'-GATCTGTTCA TG-3' (SEC ID N°: 4);

5'-AGGCAACTGT GCTATCCGAG GGAA-3' (SEC ID N°: 5); y

5'-GATCTTCCCT CG-3' (SEC ID N°: 6).

[0014] Estos se usaron como se explica en el presente documento. ADNc (2 µg) bicatenario, se digirió con la endonucleasa de restricción DpnII, se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol, y se resuspendió en 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM). Doce µl (1,2 µg), de ADNc cortado se ligó a las SEC ID N°s: 1 y 2 bicatenario, en una mezcla que incluía 4 µl de la SEC ID N°: 1 (2 mg/ml) desalada, 4 µl de la SEC ID N°: 2 (1 mg/ml) desalada, 10 µl de tampón adaptador 5X (Tris-HCl 330 mM, pH 7,6, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM), 7 µl de DTT (100 mM), y 28 µl de H₂O). Los oligonucleótidos se hibridaron entre sí y a la muestra de ADN calentando la mezcla a 50°C y a continuación enfriándola a 10°C durante una hora, seguido de la adición de 5 µl de la ADN ligasa de T4, y la incubación durante 12-14 horas, a 12-16°C. Las mezclas se diluyeron añadiendo 140 µl de TE. La PCR se llevó a
35 cabo sobre muestras de 200 µl, como se describe a continuación.

Ejemplo 3

[0015] Para llevar a cabo la PCR, muestras de 200 µl que contienen 2 µl del producto de ligadura en un tampón de Tris-HCl 66 mM, pH 8,8, MgCl₂ 4 mM, (NH₄)₂SO₄ 16 mM, 33 µg/ml de BSA, 0,3 mM de cada dNTP (concentración: 500 µM), y 2 µg de la SEC ID N°: 1 primero se calentaron a 72°C durante tres minutos para retirar cualquier resto de la SEC ID N°: 2 que se hubiese hibridado al producto del Ejemplo 2. A continuación los extremos 3' se rellenaron usando 5 U de Taq polimerasa (5 minutos, 72°C). Se llevaron a cabo 20 ciclos de amplificación (1 ciclo: 1 minuto a 95°C, y tres minutos a 72°C), tras los cuales los productos se combinaron, se
 10 extrajeron con fenol, se precipitaron con etanol, y se resuspendieron en tampón TE, a una concentración de 0,5 µg/µl. En adelante, esto se denomina la representación.

Ejemplo 4

[0016] A continuación se preparó la representación por hibridación sustractiva eliminando la SEC ID N°: 1 de ella por digestión con DpnII. El resultado de la
 15 digestión se extrajo con fenol y se precipitó con etanol. En el caso de la muestra no estimulada, esto dio como resultado la conductora, mientras que la muestra estimulada dio como resultado la probadora. Las porciones de probadora (20 µg) se purificaron con gel sobre un gel de agarosa al 1,2% y se aislaron. Las muestras (2 µg) se ligaron a las SEC ID N°s: 3 y 4, de la misma forma en que se ligaron las SEC ID N°s: 1 y 2,
 20 como se ha descrito más arriba.

[0017] En un primer ciclo de hibridación sustractiva, 0,4 µg de las muestras probadoras con las SEC ID N°s: 3 y 4 ligadas a ella se mezclaron con 40 µg del ADNc conductor. La mezcla se extrajo con fenol, se precipitó con etanol, se disolvió en 2 µl de tampón 3XEE (EPPS 30 mM pH 8,0), EDTA 3 mM; pH 8,0, EDTA 3 mM. Esto se
 25 recubrió con 30 µl de aceite mineral, y se desnaturizó durante cinco minutos a 98°C. Se añadió una disolución de NaCl 5 M (0,5 µl), y el ADN se hibridó durante 20 horas, a 67°C. La mezcla de reacción se diluyó hasta 200 µl con TE, y ARNt portador. Las muestras se incubaron durante tres minutos a 72°C para separar la SEC ID N°: 4, y a continuación se prepararon cuatro reacciones de PCR (200 µl). Éstas incluían 20 µl de
 30 mezcla de hibridación diluida sin cebador, para rellenar los extremos del probador rehibridado, seguido de 10 ciclos de amplificación después de añadir muestras de la SEC ID N°: 3 (1 ciclo: 1 minuto a 95°C, tres minutos a 70°C) tras los cuales los productos se combinaron, se extrajo con fenol, se precipitó con etanol, y se resuspendió en 40 ml de tampón 0,2XTE. El ADN monocatenario se degradó mediante
 35 un tratamiento de 30 minutos de 20 µl de este material con 20 U de nucleasa de judía

muncho, a un volumen total de 40 µl. Las muestras se diluyeron (1:5), en Tris-HCl 50 mM, a pH 8,9, seguido de calentamiento durante cinco minutos a 98°C para inactivar la enzima. Se llevó a cabo una segunda PCR, usando 20 µl del producto descrito anteriormente, 2 µl de la SEC ID N°: 3 (1 mg/ml), y 1 µl (5 U) de ADN Taq polimerasa. Se llevaron a cabo un total de 18 ciclos (1 ciclo: 1 minuto a 95°C, tres minutos a 70°C). Los productos se combinaron, se extrajo con fenol, se precipitó con etanol, y se resuspendió a 0,5-1 µg/µl. El producto se denomina en adelante "DP1", o el primer producto diferenciado.

Ejemplo 5

10 **[0018]** A continuación el DP1 se digirió con la endonucleasa DpnII, como se ha descrito anteriormente, y se ligó a las SEC ID N°s: 5 y 6, siguiendo los mismos procedimientos descritos para las SEC ID N°s: 1, 2, 3 y 4. Se repitieron la hibridación sustractiva y la amplificación selectiva, como se describe en el Ejemplo 4, y se generó un segundo producto diferenciado, o "DP2". En estos experimentos, el probador eran
15 50 ng de DP1. El conductor (40 µg) era como se ha descrito anteriormente. El proceso se repitió para generar un tercer producto diferenciado, usando las SEC ID N°s: 3 y 4 como adaptadores. Para generar el tercer producto, se mezclaron 100 pg de probador con 40 µg de conductor. Todas las etapas de los protocolos anteriores se repitieron, excepto la amplificación final que se llevó a cabo durante 22 ciclos, donde un ciclo
20 corresponde a un minuto a 95°C, y tres minutos a 70°C. Esto dio el producto diferenciado final.

Ejemplo 6

[0019] Los productos diferenciados finales se digirieron con DpnII, y a continuación se clonaron en el sitio BamHI de un vector disponible comercialmente, es
25 decir, pTZ19R. Se prepararon plásmidos de ADN bicatenario, y a continuación se secuenciaron, usando procedimientos habituales. La secuencia se compararon con secuencias conocidas del GenBank y las bases de datos del EMBL, usando el programa de búsquedas BLAST.

[0020] Al final de este procedimiento de sustracción, se identificó un fragmento
30 de ADNc corto, es decir, un fragmento de una longitud de 200 pares de bases aproximadamente. Este fragmento se usó para seleccionar una librería de ADNc procedente de células BW 5147. Se secuenció el clon más largo. Esto se describe más adelante. No se corresponde con ninguna secuencia conocida.

[0021] La secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 7), tiene una longitud de 1119
35 bases, incluyendo un marco de lectura abierto de 537 pares de bases, que codifica una

proteína con una longitud de 179 aminoácidos. El peso molecular predicho de la proteína es de 20.093. Existen dos codones ATG adicionales que, si actuasen como codones de iniciación, producirían proteínas con una longitud de 172 y 167 aminoácidos, con pesos moleculares de 19.335 y 18.770 daltons, respectivamente.

- 5 Cada forma de la proteína está caracterizada por una secuencia de aminoácidos hidrófobos que se escindirían de la molécula a través del retículo endoplasmático para dar una proteína madura.

[0022] El análisis de la secuencia muestra tres motivos ricos en AT (TTATTTAT). Estos motivos se encuentran a menudo en regiones 5' sin traducir de
10 citocinas y oncogenes. Kruys, y col., Science 245: 852 (1989), han demostrado que estas repeticiones modulan la estabilidad del ARNm.

Ejemplo 7

[0023] El ADNc aislado y analizado en el Ejemplo 6, anteriormente, a continuación se usó como sonda para identificar ADN genómico para TIF α .

- 15 [0024] Se seleccionó una librería genómica preparada a partir de la cepa de ratón 129 con la SEC ID N°: 7, siguiendo procedimientos habituales. Un fragmento de EcoRI procedente de un clon positivo se subclonó en el plásmido pZERO y se secuenció parcialmente. La secuencia parcial se presenta como SEC ID N°: 8.

Ejemplo 8

- 20 [0025] También se subclonó un segundo fragmento EcoRI a partir del clon positivo descrito en el Ejemplo 7, anteriormente. Había un alto grado de homología, pero las secuencias no eran idénticas. Para ser específicos, el intrón 1 de esta secuencia era idéntico en un 98% a la SEC ID N°: 8, el intrón 2 era un 100% idéntico y el intrón 3 era un 92% idéntico.

- 25 [0026] Lo que es llamativo sobre las secuencias es que los promotores no son homólogos en absoluto, sugiriendo una regulación independiente. Las regiones 5' sin traducir son idénticas en un 92%. El primer exón para TIF α se separa en el exón 1 α y el exón 1 β . El primer exón codificante (que es el exón 1b para TIF α y el exón 1 para TIF β) son idénticos en un 99,5%, mientras que los segundos exones son idénticos en
30 un 100%, los terceros exones son idénticos en un 97%, los cuartos exones son idénticos en un 98,5%, y en un 96% para el quinto exón. En la región 3' sin traducir, la homología es del 96%.

Ejemplo 9

- [0027] Usando la información descrita en el Ejemplo 8, anteriormente, se dedujo
35 una secuencia de ADNc para el segundo clon, denominado TIF β , y se expresó como

SEC ID N°: 9. También se valoró la secuencia de ADN genómico, de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se expresa como SEC ID N°: 42. La secuencia de aminoácidos es la SEC ID N°: 41.

[0028] Comparado con la región codificante para TIF α , la de TIF β tiene seis cambios silenciosos. Hay dos cambios que dan como resultado un cambio de aminoácidos sin consecuencias (en ambas posiciones 36 y 103, la Val en TIF α se convierte en Ile en TIF β). También hay un cambio más significativo, en la posición 112, en la que la Gln se convierte en Arg.

Ejemplo 10

10 **[0029]** Se llevaron a cabo experimentos para estudiar la expresión de los TIF. Las células BW 5147 se estimularon con IL-9 murina recombinante (200 U/ml), durante periodos variables de tiempo (0,2, 0,5, 1, 2 y 24 horas). A continuación se aisló el ARN total, usando procedimientos y reactivos habituales. A continuación se llevó a cabo la transcripción inversa, usando 5 μ g del ARN total y un cebador de oligo(dT).

15 Las muestras de ADNc que corresponden a 20 ng de ARN total a continuación se amplificaron durante 25 ciclos usando diferentes cebadores. (Un ciclo corresponde a 4 minutos a 94°C, 1 minuto a 57°C, y 2 minutos a 72°C). Los cebadores TIF fueron:

5'-CTGCCTGCTT CTCATTGCCC T-3' (SEC ID N°: 10)

y

20 5'-CAAGTCTACC TCTGGTCTCA T-3' (SEC ID N°: 11)
(sentido directo y contrario, respectivamente).

[0030] Esto corresponde a los nucleótidos 107-127, y 766-786 de la SEC ID N°: 7, respectivamente. Como control, también se amplificó β -actina, durante 18 ciclos (primer ciclo: 4 minutos a 94°C, 1 minuto a 60°C, 2 minutos a 72°C. Los siguientes

25 ciclos fueron 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 2 minutos a 72°C).

[0031] Después de la amplificación, los productos obtenidos de la PCR se analizaron sobre un gel de agarosa al 1%, y se confirmó la amplificación específica, seguido de transferencia, usando sondas radiactivas internas. La sonda para el TIF fue:

5'-GACGCAAGCA TTTCTCAGAG-3' (SEC ID N°: 12)

30 las condiciones y las sondas expuestas no eran específicas para una u otra forma del TIF; no obstante, el producto de amplificación del TIF α contiene un sitio de restricción KpnI, mientras que el sitio de restricción para el TIF β no lo contiene. La digestión de los productos de amplificación con KpnI indicaba que la mayoría, sino todo, el ARNm del TIF inducido por IL-9 era TIF α , lo que sugiere que la expresión de TIF α se indujo

35 rápidamente a través de la IL-9. El ARNm para el TIF α fue detectable después de 30

minutos de estimulación, y alcanzó una meseta durante un período de tiempo de 1-24 horas.

Ejemplo 11

[0032] A continuación se llevaron a cabo experimentos que muestran que la inducción de ARNm del TIF por IL-9, descrita más arriba, no requiere la síntesis de proteínas. En estos experimentos, se extrajo el ARN total de células estimuladas durante 24 horas, como se describe en el Ejemplo 10, pero con o sin 10 µg/ml de un inhibidor de la síntesis de proteínas, la cicloheximida, durante 4,5 horas. En un grupo de experimentos en paralelo, las células no se estimularon. Se extrajo el ARN total, y la amplificación por RT-PCR se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 10. Los productos obtenidos de la PCR se analizaron sobre un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Lo que se observó fue que la inducción por IL-9 aún se producía cuando la síntesis de proteínas estaba bloqueada. Por tanto, el efecto de la IL-9 es un efecto directo, que no requiera la síntesis de un mediador proteico.

Ejemplo 12

[0033] En estos experimentos se estudió el papel de las proteínas STAT en la inducción del ARNm del TIF sobre derivados de la línea celular BW5147. La primera línea, BWh9R, expresa receptores de IL-9 humana de tipo silvestre. La línea BW-Phe116 es un transfectante con una mutación sencilla (en la posición 116), que hace que el receptor sea incapaz de activar los factores de transcripción STAT. Otra línea celular más, la BW-mut6, tiene una mutación que hace que el receptor sea incapaz de activar la STAT5, mientras retiene la capacidad para activar la STAT1 y la STAT3. Finalmente, la línea celular BW-mut7 tiene una mutación sencilla que hace que el receptor de la IL-9 sea incapaz de activar la STAT1 y la STAT3, pero que retiene la capacidad de activar la STAT5.

[0034] La estimulación celular, el aislamiento del ARN total, la transcripción inversa y la amplificación del ADNc se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 10 (las células se estimularon durante 24 horas. Se usó IL-9 recombinante tanto humana como murina). Los productos de la PCR se analizaron sobre un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, como se ha descrito anteriormente.

[0035] El análisis reveló que la IL-9 humana no inducía la expresión en BW-Phe116, lo que sugiere que están implicados factores de transcripción STAT. Se encontró que la IL-9 inducía la expresión del TIF en el mutante BW-mut6, pero no en la variante mut7, lo que sugiere que están involucradas las STAT1 o STAT3, pero no la STAT5.

Ejemplo 13

[0036] A continuación se estudió la expresión del ARNm del TIF en células normales de bazo de ratón.

[0037] Se cultivaron células de bazo procedentes de ratones Balb/c de 10-12 5 semanas de edad durante 24 horas en medio de control o en medio de control suplementado con 20 µg/ml de LPS (que activa los linfocitos B y los macrófagos), o ConA (que activa las células T), o ConA más el 1% de un antisuero de bloqueo contra IL-9 murina, usando β-actina como control. La purificación del ARN y el análisis por RT-PCR se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente.

10 **[0038]** Los datos indican que el TIF se expresa, en el mejor de los casos, muy débilmente en células de bazo en reposo, no inducidas por el LPS, pero son fuertemente inducidas por ConA. El antisuero anti-IL-9 no afectó a la inducción por ConA, lo que sugiere que su efecto no está mediado por IL-9, o está mediado por otras citocinas.

15 **[0039]** Cuando las células de bazo activadas por ConA se analizaron usando secuencias de los productos de la RT-PCR, se encontró que estas células estaban expresando predominante, o exclusivamente TIFα.

Ejemplo 14

[0040] Experimentos adicionales demostraron que el ARNm del TIF se expresaba 20 incluso en ausencia de inducción por IL-9.

[0041] Células de bazo procedentes de ratones FVB de 5 semanas de edad se enriquecieron en células T, usando una columna de lana de nailon. A continuación, las células se estimularon durante 24 horas en medio suplementado con ConA (un activador de células T), o PMA (que activa el PKC en la mayoría de las células), ya sea 25 con o sin IL-9.

[0042] El ARN total se aisló usando técnicas habituales, y a continuación muestras de 10 µg se fraccionaron mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1,3% que contiene formaldehído 2,2 M. A continuación las fracciones se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se marcaron, y se sometieron a un ensayo de 30 hibridación siguiendo a Van Snick, y col., J. Exp. Med. 169: 363 (1989), incorporado por referencia.

[0043] Los resultados indican que la inducción del TIF mediante ConA no se modificó, y que la IL-9 no indujo el ARNm del TIF en células de bazo activadas con PMA.

35 Ejemplo 15

[0044] Se probó la expresión del ARNm del TIF en diversas líneas celulares. En estos experimentos, líneas celulares murinas se estimularon durante al menos un día, con una citocina particular. Específicamente, la 9T7 es un linfoma de células T, que responde a la IL-2, IL-4 o IL-9. Las líneas celulares TS3 y TS6 proceden de clones de
5 células T ayudantes, y proliferan en presencia de IL-2 o IL-9. La MC9 y LI38 son líneas de mastocitos, que proliferan en presencia de IL-3 o IL-9.

[0045] Después de la estimulación, se preparó ARN total usando lisados con isotiocianato de guanidina habitual, y centrifugación en gradiente de CsCl.

[0046] A continuación se analizó la línea 9T7 por transferencia Northern, como se
10 describe en el Ejemplo 14, mientras que las otras líneas se sometieron a ensayo usando análisis RT-PCR, como se ha descrito anteriormente.

[0047] Se encontró que la IL-9 regula en exceso la expresión del TIF en células T ayudantes y mastocitos, mientras que la IL-2 y la IL-3 no. No obstante, la línea celular 9T7 mostró prácticamente el mismo nivel de expresión, independientemente de la
15 citocina, lo que indica que la IL-9 no es imprescindible para la expresión del TIF.

Ejemplo 16

[0048] A continuación se estudió la expresión del ARNm del TIF en líneas de células B. Las líneas celulares A20, 70Z/3, y BCL-1 son líneas celulares de leucemia de células B que crecen, *in vitro*, sin citocinas. Estas células se estimularon durante 24
20 horas con IL-4 e IL-9 y el ARN total se aisló usando procedimientos habituales. La expresión se analizó mediante RT-PCR que se llevó a cabo durante 35 ciclos, seguido por transferencia e hibridación, como se ha descrito anteriormente.

[0049] Los resultados indican que la expresión del TIF es detectable en células B, pero en el mejor de los casos se regula débilmente hacia arriba en presencia de IL-9 e
25 IL-4.

Ejemplo 17

[0050] A continuación se llevaron a cabo experimentos para estudiar la expresión de las moléculas de la invención en líneas de células T ayudantes. Las TS2 y TS1 son líneas de células T ayudantes conocidas, procedentes de clones de células T ayudantes,
30 que proliferan en presencia de IL-9 o IL-2 (TS2), y cualquiera de IL-9 o IL-4 (TS1). Específicamente, las células TS1 o TS2 se crecieron en presencia de las citocinas listadas durante al menos 10 días, tras los cuales el ARN se extrajo usando procedimientos conocidos. La expresión de las moléculas se estudió mediante la RT-PCR (35 ciclos), usando los protocolos descritos anteriormente. En las células TS1
35 tanto la IL-4 como la IL-9 inducen la expresión del TIF, pero la IL-2 no lo hace en

células TS2.

Ejemplo 18

[0051] Se estudió la expresión del ARNm del TIF en diversos órganos de ratón. El ARN total se preparó a partir de hígado, riñón, corazón, cerebro, intestino, bazo, timo, pulmón, músculo y médula ósea, usando las metodologías habituales con isotiocianato de guanidina y centrifugación en gradiente de CsCl. Se llevaron a cabo 40 ciclos de RT-PCR, usando los protocolos descritos anteriormente. La expresión más fuerte se encontró en el tejido del timo, mientras que se encontraron señales menos intensas en tejido de cerebro, y la expresión más débil en los tejidos restantes.

10 Ejemplo 19

[0052] Los siguientes experimentos describen la producción del TIF α en células 293-EBNA.

[0053] El ADN complementario para el TIF α se ha descrito anteriormente. Se subclonó en un vector de expresión pCEP-4 disponible comercialmente, en una unión operable con el promotor del CMV. Los plásmidos resultantes se transfectaron en células 293-EBNA, usando procedimientos de lipofectamina habituales. Después de la transfección, las células se incubaron en medio exento de metionina, suplementado con metionina marcada con ^{35}S , durante 24 horas. Se recogió el sobrenadante, y se corrió sobre un gel de acrilamida, seguido de electroforesis. A continuación el gel se secó y se expuso a autorradiografía durante un día. A continuación se corrió un control transfectando células con el mismo plásmido, en el que el ADNc se clonó en la dirección sentido contrario.

[0054] Se encontró una banda heterogénea de 25-30 kilodaltons aproximadamente procedente de las células transfectadas con TIF en la dirección sentido. Cualquier discrepancia entre el peso molecular predicho, el peso molecular real en el sistema, y la heterogenicidad, se puede atribuir a la glicosilación. En una serie de experimentos paralelos, se expresó ADNc que codifica TIF humano de la misma forma que se expresó el ADNc murino. Con la excepción del cambio del ADNc, todos los parámetros experimentales eran idénticos.

30 Ejemplo 20

[0055] Se llevaron a cabo experimentos adicionales para estudiar la producción de TIF α en células COS. Específicamente, se subclonó ADNc de TIF α en el plásmido pEF-BOS.puro descrito por Demoulin y col., anteriormente, en unión operable con el promotor EF-1 α . El ADNc plasmídico se transfectó en células COS, usando el mismo procedimiento de lipofectamina descrito anteriormente. Las células se incubaron en

medio exento de metionina, se suplementaron con metionina ^{35}S durante 24 horas, tras las cuales el sobrenadante se trató como se ha descrito en el Ejemplo 19, anteriormente. De nuevo, se observó una banda heterogénea de 25-30 kilodaltons, así como una banda de 18 kilodaltons, que probablemente representa una forma no

5 glicosilada de la molécula.

Ejemplo 21

[0056] En estos experimentos, se descubrió que el TIF induce la activación de STAT en células mesangiales, de melanoma neuronal y de hepatoma. Es sabido que cuando las citocinas activan los factores STAT, los factores dimerizan, se trasladan del

10 citoplasma al núcleo, y se unen a secuencias diana en los promotores. Los detalles de los experimentos son los siguientes.

[0057] Se usaron células 293-EBNA transfectadas como se ha descrito anteriormente después de la incubación en medio normal durante 48 horas, al igual que el sobrenadante procedente de los controles, también descrito anteriormente. Se usaron

15 las muestras de una línea celular mesangial de riñón de ratón ("MES13" en adelante), una línea celular de feocromocitoma de rata ("PC12" en adelante), cuatro melanomas humanos diferentes (SK23, AUMA, NA-8mel y MULL), hepatoma humano (HepG3) y hepatoma de rata (H-4-II-K). Las muestras celulares ($0,5 \times 10^6$) se estimularon durante 5-10 minutos en presencia del 1% de sobrenadante. A continuación se

20 prepararon extractos nucleares, de acuerdo con Demoulin y col., Mol. Cell. Biol. 16: 4710 (1996), incorporado por referencia. Resumiendo, las células se lavaron con PBS y a continuación se resuspendieron en 1 ml de tampón hipotónico enfriado en hielo durante 15 minutos. (El tampón era tampón HEPES 10 mM, pH 7,5, con KCl 10 mM, MgCl_2 1 mM, 5% de glicerol, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,1 mM, ditiotreitól 0,5 mM, y

25 Pefabloc 1 mM, Na_3V_4 1 mM, y NaF 5 mM). A continuación las células se lisaron añadiendo 65 μl de NP-40, seguido del paso por el vortex. Los núcleos se sedimentaron, pasándolos por el vortex durante 30 segundos a 14.000 rpm, seguido de la extracción en tampón suplementado con HEPES (20 mM), glicerol (20%), y NaCl (420 mM). Los restos nucleares se eliminaron por centrifugación durante 2 minutos.

30 La actividad de unión del ADN se determinó de acuerdo con Demoulin y col., anteriormente, usando un oligonucleótido bicatenario marcado con ^{32}P denominado "GRR", que contiene el sitio de unión STAT del promotor del gen PcyRI, es decir:

5'ATGTATTTCC CAGAAA-3' (SEC ID N°: 13)

y

35 5'-CCTTTTCTGG GAAATAC-3' (SEC ID N°: 14)

correspondientes a las hebras superior e inferior de los sitios de unión en la sonda GRR. En resumen, un volumen de 5 µl de extractos nucleares se incubó en tampón de unión (HEPES 12 mM, pH 7,6, KCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, 2,5% de glicerol, 0,1 mg de poli(dI-dC) por ml) durante 5 minutos. Se añadió la sonda GRR radiomarcada (10^5 cpm; 0,5 ng aproximadamente), y se prosiguió con la incubación durante 25 minutos antes de cargarla sobre un gel de poliacrilamida no desnaturalizante.

[0058] También se notó que los complejos observados en células MES13, descritos anteriormente, fueron parcialmente sobrevalorados por ambos anticuerpos anti-STAT5 y anti-STAT3, demostrando que (i) las células en observación eran dianas para el TIF, y (ii) que STAT3 y STAT5 son componentes principales del complejo activado por el TIF. La diferencia en el perfil STAT, comparado con el perfil del Ejemplo 12, anteriormente, es atribuible a la diferencia en la fuente de células (ser humano frente a ratón). También se observó que el TIF humano funciona sobre células murinas, y viceversa.

15 Ejemplo 22

[0059] Este ejemplo detalla el aislamiento y la clonación de una molécula de ácidos nucleicos que codifica el TIF humano. En primer lugar, se prepararon células mononucleares de sangre periférica humana mediante la centrifugación en gradiente de densidad habitual. Después de esta preparación, las muestras se cultivaron durante 24 horas, a 3×10^6 células/ml, con o sin anticuerpo monoclonal dirigido contra CD3 (el anticuerpo era el anticuerpo disponible comercialmente mAb OKT3, usado en forma de ascitos fluidos a una dilución de 1/500). Se usó este anticuerpo debido a que las citocinas derivadas de células T generalmente sólo se expresan tras la activación mediante, por ejemplo, anticuerpos específicos CD3.

[0060] Se aisló el ARN total a partir de estas células, usando técnicas de ultra centrifugación habituales con isotiocianato de guanidina/CsCl. Después del aislamiento, muestras de 10 µg del ARN se sometieron a la transcripción inversa usando un cebador oligo(dT)15.

[0061] Después de la preparación de ADNc, como se ha resumido anteriormente, se amplificaron muestras que correspondían a 100 ng de ARN total, a través de la PCR, usando los siguientes cebadores:

5' - AGGTGCTGAA CTTACCCTG GA - 3' (SEC ID N°: 15)

5' - CCACTCTCTC CAAGCTTTTT CA - 3' (SEC ID N°: 16)

que se basan en una secuencia de ADNc murino, (es decir, SEC ID N°: 7). Las condiciones de la PCR suponían 30 ciclos de amplificación, con un ciclo definido

como 1 minuto a 94°C, seguido de 1 minuto a 42°C, y a continuación 2 minutos a 72°C. El producto de amplificación se separó en un gel de agarosa, usando procedimientos habituales, y a continuación se secuenció. El resultado indicaba que se habían amplificado fragmentos del ADNc. Por tanto, se llevó a cabo una segunda
 5 reacción, usando los mismos materiales, excepto que la SEC ID N°: 16 se sustituyó por SEC ID N°: 17, es decir:

5' -CAAGTCTACC TCTGGTCTCA T- 3'

[0062] Esta reacción de PCR se llevó a cabo durante 25 ciclos, con un ciclo que se define como 1 minuto a 94°C, seguido de 1 minuto a 45°C, y a continuación 2 minutos
 10 a 72°C. El producto de amplificación se sometió a las mismas etapas que el primero. Se amplificó un fragmento de 418 nucleótidos, que se encontró en células estimuladas con anticuerpo dirigido contra CD3, pero no en PBMCs en reposo. Este fragmento de secuencias de nucleótidos se expresa como SEC. ID N°: 18.

Ejemplo 23

15 **[0063]** Después de la preparación del producto de amplificación, se aisló el extremo 5' del ADNc usando técnicas 5'-RACE habituales. Resumiendo, la primera hebra del ADNc se preparó usando la SEC ID N°: 19 como cebador, es decir:

5' - TGGCCAGGAA GGGCACCACC T - 3'

[0064] Este cebador se basa en la información de secuencia obtenida de acuerdo
 20 con el ejemplo 22. Resumiendo, el procedimiento del 5'-RACE se llevó a cabo combinando 1 µg de ARN total, preparado como se describe anteriormente, 2,5 pmoles de la SEC ID N°: 19, transcriptasa inversa, tampón de la transcriptasa inversa, 2,5 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 2,5 µl de MgCl₂ (25 mM), y 2,5 µl de ditiotreitól (0,1 M). La reacción se llevó a cabo y, después de completarse, el ARN original se eliminó
 25 mediante la adición de Rnasa H, y Rnasa TI. Todos los dNTPs no incorporados, así como los cebadores y proteínas, se eliminaron. El ADNc se extendió en sus extremos usando la transferasa terminal o "TdT". Esta enzima crea un sitio de unión en 3' para el cebador de anclaje acortado, como se describe a continuación. La extensión de los extremos se llevó a cabo combinando la primera hebra de ADNc purificada, TdT,
 30 tampón (Tris-HCl 10 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 1,5 mM), y 200 µM de dCTP.

[0065] Después de la reacción de extensión de los extremos, se llevó a cabo una PCR usando:

5' - CCTATCAGAT TGAGGGAACA G - 3' (SEC ID N°: 20)

y el cebador de anclaje acortado 5'-RACE:

35 5' - GGCCACGCGT CGACTAGTAC GGGIIGGGIIGGGIIG - 3' (SEC ID N°: 21).

[0066] La amplificación supuso 35 ciclos (1 ciclo se define como 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, y 2 minutos a 72°C). Después de esto, se realizó una amplificación anidada sobre 5 µl de una dilución 1/100 del producto de amplificación, usando la SEC ID N°: 20 y el cebador de amplificación universal acortado:

5 5' - GGCCACGCGT CGACTAGTAC - 3' (SEC ID N°: 22).

[0067] La amplificación supuso 30 ciclos (1 ciclo que se define como 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, y 2 minutos a 72°C). El producto resultante de la PCR se clonó, siguiendo procedimientos habituales, y se secuenció.

[0068] Estos tres protocolos, es decir, los dos experimentos descritos
10 anteriormente que generan fragmentos, y la PCR 5'-RACE, también descrita anteriormente, permitieron el alineamiento del producto de amplificación secuenciado, para generar la secuencia completa.

[0069] Después del alineamiento, se generaron oligonucleótidos que flanqueaban el marco de lectura abierto deducido, es decir:

15 5' - CCTTCCCCAG TCACCAGTTG - 3' (SEC ID N°: 23)

y

5' - TAATTGTTAT TCTTAGCAGG - 3' (SEC ID N°: 24).

Estos cebadores se usaron para amplificar el marco de lectura abierto completo, usando ARNm procedente de células estimuladas con mAb específico de CD3, como se ha
20 descrito anteriormente. Para la amplificación, 25 ciclos (1 ciclo que se define como 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, y 2 minutos a 72°C).

[0070] La secuencia completa del ADNc humano se expresa en la SEC ID N°: 25. Contiene un ORF de 537 pares de bases que codifica una proteína de 179 aminoácidos. Esta es la misma longitud que la proteína murina. La proteína humana tiene una
25 homología de aminoácidos del 79% con la proteína murina, y una homología del 25% con la IL-10. Las proteínas humana y murina se expresan como las SEC ID N°s: 43 y 40, respectivamente.

Ejemplo 24

[0071] Estos experimentos detallan el trabajo sobre el aislamiento del ADN
30 genómico humano correspondiente al ADNc descrito anteriormente.

[0072] Basándose en las secuencias de ADNc, se desarrollaron cebadores que corresponden a los nucleótidos 51-70 y el complemento de los nucleótidos 631-650 de la SEC ID N°: 25. Se llevó a cabo la PCR, usando la metodología habitual. Específicamente, como molde se usaron 100 ng de ADN genómico obtenido de células
35 CESS (una línea celular linfoblastoide transformada con el EBV), y se llevaron a cabo

33 ciclos de amplificación (un ciclo de amplificación que se define como 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante 5 minutos). Una vez se hubo aislado una secuencia, se secuenció, y ésta se expresa como SEC ID N°: 26. La secuencia tiene una longitud de 4,8 kilobases aproximadamente, y se cree que contiene la secuencia genómica completa que codifica la molécula del TIF, que carece solamente de la región flanqueante 5', el promotor, y el extremo 3'. Los análisis indican que contiene 6 exones y 5 intrones, al igual que la secuencia genómica murina.

[0073] Se llevó a cabo una hibridación de transferencia Southern, usando procedimientos habituales. Mostró que el genoma solamente contiene una única copia del gen TIF.

Ejemplo 25

[0074] Era interesante identificar dónde estaba localizado el ADN genómico descrito anteriormente dentro del genoma humano. Para conseguir esto, se adoptaron dos aproximaciones diferentes. En la primera, la secuencia descrita anteriormente, es decir, la SEC ID N°: 26, se marcó con un marcador fluorescente, y a continuación se usó para sondear el genoma humano a través de hibridación fluorescente *in situ* ("FISH") usando procedimientos habituales.

[0075] En una segunda aproximación, se seleccionó un plantel de clones híbridos radiactivos usando la sonda constituida por los nucleótidos 51-70 de la SEC ID N°: 25, y 5'-ATCAGATGGA TTACTGAATG-3' (SEC ID N°: 27). Se llevó a cabo la PCR usando 25 ng de ADN genómico como molde, durante 35 ciclos, donde un ciclo se define como 94°C durante 1 minuto, 55° C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos.

[0076] Ambas metodologías indicaban que el gen está localizado en el cromosoma 12q15. Algún trabajo relaciona enfermedades asociadas al asma con este sitio. Véase, por ejemplo, Nat. Genet. 15:389-392 (1997); Ober, y col., Hum. Mol Genet. 7(9):1393-1398(1998); Nickel, y col., Genomic 46(1):159-162(1997); Takahashi, y col., Genomics 44(1):150-2(1997); Barnes, y col., Genomics 37(1):41-50(1996), todos ellos incorporados por referencia.

[0077] Se consultaron bases de datos públicas para determinar si alguna parte de las secuencias estaba presente en éstas. El último exón del TIF se encontró en un clon BAC, procedente del cromosoma 12q15. (Número de acceso: AC007458; 191.111 pares de bases, BAC RDCI11-444B24). La identificación del último exón en este clon sugiere que el gen TIF está localizado a 90 kilobases aproximadamente del gen IFN, y a menos de 30 kilobases de un gen denominado AK155, que es una citocina

relacionada con la IL-10 (Knappe, y col., J. Virol 74:3881-3887 (2000)).

Ejemplo 26

[0078] Estos experimentos describen la preparación de anticuerpos que se unen a la proteína TIF. Para prepararlos, se acopló un péptido constituido por los aminoácidos 40-61 codificados por la SEC ID N°: 7 a la proteína portadora KLH, usando procedimientos habituales y una relación de 1 mg de péptido por 1 mg de proteína portadora. Los animales objeto (conejos), fueron inmunizados 3 veces, en intervalos de dos semanas, con 150 µg del complejo. El inmunógeno se emulsionó en adyuvante completo de Freund para la primera inyección, y a continuación con adyuvante incompleto de Freund para las dos siguientes.

[0079] Se llevó a cabo una primera sangría un mes después de la última inyección, y se preparó suero, siguiendo procedimientos conocidos.

[0080] A continuación el suero se probó en una transferencia de Western estándar. Resumiendo, 10 µl de sobrenadante procedente de células transfectadas con la SEC ID N°: 7 o la SEC ID N°: 25 se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE, y a continuación se transfirieron sobre membranas de PVDF. El antisuero se diluyó a 1:500, y se usó en un protocolo de transferencia Western estándar, junto con anticuerpo anti-conejo como anticuerpo secundario, y un kit de detección disponible comercialmente.

[0081] Se encontró que, de hecho, el suero reconocía la proteína TIF.

Ejemplo 27

[0082] Este ejemplo describe experimentos llevados a cabo para identificar líneas celulares que responden al TIF humano. Células de riñón embrionario humano HEK293-EBNA, descritas anteriormente, se sembraron en placas de 6 pocillos, a 3 x 10⁵ células/pocillo un día antes de la transfección. Se transfectaron con 2 µg de plásmido pCEP-4 que contenía ADNc para TIF humano, bajo el promotor del CMV. Las células se incubaron después de la transfección, en 1,5 ml de medio normal, durante 3 días, para maximizar la producción de TIF humano recombinante.

[0083] Se propuso la hipótesis de que el TIF humano induciría la activación de los factores de transcripción STAT de la misma forma que lo hacía el factor murino. Se siguió el protocolo del ejemplo 21, más arriba. Se llevaron a cabo sobrevaloraciones añadiendo anticuerpos dirigidos contra STAT (0,75 µg de anti-STAT 1, 1 µg de anti-STAT 3, o 1 µg de anti-STAT 5b), a mezclas de extractos nucleares y sondas de ADN marcadas, y se incubó.

[0084] Se observó un desplazamiento de las bandas inducido por el TIF cuando se

usó la línea celular de hepatoma HepG2. Los anticuerpos descritos anteriormente se usaron para caracterizar la respuesta en profundidad. Los anticuerpos dirigidos contra STAT-3 desplazaron la mayoría de los complejos de retardo, aunque el resto de complejos débiles fueron sobrevalorados por anticuerpos dirigidos contra STAT-1. Los anticuerpos dirigidos contra STAT-5 no tuvieron ningún efecto. Esto indica que el STAT-3 y, en un menor grado, el STAT-1 son los factores de transcripción principales activados por el TIF. Estos resultados también se obtuvieron usando la línea celular de hepatoma humano HepG3, y también la línea celular de hepatoma H4IIE.

Ejemplo 28

10 **[0085]** Este ejemplo describe experimentos diseñados para medir la activación de STAT por medio de un gen informador. El informador era "GRR5". Éste contiene 5 copias de la secuencia presentada en el Ejemplo 21, aguas arriba de un gel de la luciferasa bajo el control del promotor TK. El control era el vector pRL-TK, que contiene el gen de la luciferasa de *remilla*, bajo el control del promotor TK.

15 **[0086]** El ensayo se llevó a cabo combinando 10^6 células de HepG2 con 15 μg de GRR5, y 1 μg de Prl-TK (250V, 74Ω , 1200 μF). El conjunto de transfectantes se dividió en placas de 24 pocillos (42.000 células/pocillo).

[0087] Después de 1 hora, las células se estimularon con TIF humano (sobrenadante de las células HEK293 al 1%) con 300 U/ml de IL-6 humana, 20 sobrenadante al 1% procedente de células HEK293 transfectadas con un vector vacío, o medio solo.

[0088] Después de dos horas, las células sedimentaron, y se lisaron. La actividad luciferasa se controló usando metodologías habituales. Los resultados indican que la estimulación con la molécula de la invención incrementa la actividad transcripcional 25 de un promotor que incluye los sitios de unión a STAT.

Ejemplo 29

[0089] Se sabe que la activación de STAT-3 por citocinas de tipo IL-6 da como resultado la inducción de proteínas de fase aguda en células de hepatoma. Para determinar si el TIF ejercía la misma actividad, 5×10^6 células de HepG2 se 30 estimularon durante 2, 13, o 24 horas, con sobrenadante al 1% procedente de células HEK293-EBNA infectadas transitoriamente. En algunos experimentos se usó el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se combinó con las células y el sobrenadante. Después de la estimulación, el ARN total se aisló usando procedimientos habituales, y se llevó a cabo la transcripción inversa 35 sobre muestras de 10 μg de ARN total, usando un cebador oligo(dT). A continuación,

se amplificó ADNc correspondiente a 20 ng de ARN, durante 18 ciclos, con cebadores específicos para el amiloide A sérico humano ("SAA"), es decir:

agctcagcta cagcacagat

(sentido directo, SEC ID N°: 28)

5 cctgccccat ttattggcag

(sentido contrario, SEC ID N°: 29)

antiquimotripsina α 1 humana:

gtcctctgc caccctaaca

(sentido, SEC ID N°: 30)

10 taattcacca ggaccatcat

(sentido contrario, SEC ID N°: 31)

para la haptoglobina humana:

gtggactcag gcaatgatgt

(sentido, SEC ID N°: 32)

15 acatagagtgt taaagtggg

(sentido contrario, SEC ID N°: 33)

y para la β -actina humana:

gctggaaggt ggacagcgag

(sentido, SEC ID N°: 34)

20 tggcatcgtg atggactccg

(sentido contrario, SEC ID N°: 35).

Para el SAA, la T_m era de 54°C, mientras que para la antiquimotripsina α 1 y la haptoglobina humanas era de 52°C, y de 56°C para la β -actina. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, usando

25 procedimientos habituales.

[0090] Los resultados indicaban que el TIF inducía fuertemente el SAA y la quimotripsina α 1 y, en un menor grado, la haptoglobina. Para determinar si el TIF regula directamente hacia arriba el SAA, o si es necesaria la síntesis de proteínas, se estimularon células HEPG2, como se ha descrito, en presencia de cicloheximida. La

30 expresión de SAA no se vio afectada, lo que indica que la síntesis de proteínas no era necesaria para la actividad TIF.

Ejemplo 30

[0091] Los resultados, más arriba, muestran que el TIF y la IL-6 parecen tener actividades similares sobre reactivos de fase aguda. Puesto que la actividad IL-6 está

35 mediada a través de gp 130, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la

actividad TIF está mediada también a través de gp 130.

[0092] Para determinar si éste era el caso, células HepG2 se transfectaron con un informador luciferasa, como se ha descrito anteriormente, y a continuación se estimularon con TIF o IL-6, en presencia de anticuerpos policlonales anti-gp 130 de los que se había determinado previamente que bloquean la actividad de citocinas que interaccionan con gp 130.

[0093] Los resultados indicaban que los anticuerpos policlonales sólo bloqueaban la actividad IL-6.

[0094] Se llevaron a cabo experimentos paralelos para determinar si estaba implicada la cadena β del IL-10R. En presencia de anticuerpos anti-IL-10R β , la actividad TIF se bloqueó completamente mientras que la actividad IL-6 permaneció inalterada. Se observó el mismo efecto con el ensayo para la expresión de SAA.

Ejemplo 31

[0095] Estos experimentos se diseñaron para determinar la capacidad de TIF para regular las proteínas de fase aguda *in vivo*.

[0096] Se inyectaron cantidades variables de TIF murino recombinante (50, 12,5, 3,2, 0,8 o 0,2 μ g), intraperitonealmente, en ratones hembra C3H/HeJ resistentes a endotoxina (10-12 semanas de edad). Seis horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados, con la excepción de los ratones que habían recibido 50 μ g de TIF, que se sacrificaron después de 1, 3, 6, 12, o 24 horas. Se extrajeron los hígados y se congelaron directamente en nitrógeno líquido. A continuación se extrajo el ARN total, usando procedimientos habituales, tras los cuales se fraccionaron 10 μ g de muestras de ARN total sobre un gel de agarosa al 1,3% que contenía 2,2 ml/litro de formaldehído. A continuación las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

[0097] Se prepararon sondas de SAA murino, usando un kit de marcaje comercial. El ensayo de hibridación se llevó a cabo de acuerdo con Van Snick, y col., J. Exp. Med 169:363-368 (1989), incorporado por referencia. La propia sonda se obtuvo mediante PCR, como se ha descrito anteriormente, usando ADNc procedente de hígado murino, aislado como se ha descrito anteriormente. Los cebadores usados para la preparación de la sonda fueron:

tctgctccct gctcctggga

(sentido, SEC ID N°: 36)

y

tccaggaggt ctgtagtaat

(sentido contrario, SEC ID N°: 37)

Los resultados indicaban que la dosis más elevada del TIF murino (50 µg), inducía la expresión de SAA tan solo una hora después de la inyección i.p. El efecto máximo se alcanzó después de 6 horas. El nivel de expresión para el SAA se redujo 24 horas después de la inyección.

- 5 **[0098]** Los datos generados a partir de los experimentos usando dosis variables de TIF indicaban que la inducción máxima del SAA aún se producía cuando se usaban dosificaciones de 3,2 µg. El mensaje del SAA aún era detectable cuando se usaba tan solo 0,8 µg.

Ejemplo 32

- 10 **[0099]** Inicialmente, el TIF se identificó como una citocina derivada de células T. La mayoría de citocinas que regulan las fases agudas del hígado se producen principalmente durante la inflamación. Para determinar si el TIF se podría producir a través de la estimulación inflamatoria, se inyectaron intraperitonealmente *in vivo* 2 µg del antígeno lipopolisacárido de *E. coli* a ratones BALB/c hembra de 12 semanas de
15 edad. Los ratones se sacrificaron dos horas más tarde, y los órganos se congelaron en nitrógeno líquido. El ARN total se aisló siguiendo protocolos habituales, y la transcripción inversa se llevó a cabo sobre 10 µg de ARN total, usando cebadores oligo(dT). Después de la transcripción inversa, el ADN correspondiente a 20 ng de ARN total se amplificó durante 25 ciclos, usando cebadores específicos para TIF, es
20 decir:

ctgcctgctt ctcattgccc t

(sentido, SEC ID N°: 38)

y

caagtctacc tctggtctca t

- 25 (sentido contrario, SEC ID N°: 39),

que tenían una T_m de 55°C. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

- [0100]** Los resultados indicaban que el LPS inducía la expresión del TIF en todos los órganos examinados, lo que indica que el TIF está involucrado en procesos
30 inflamatorios.

[0101] Los ejemplos anteriores describen la invención que es, en una forma de realización, un anticuerpo antagonista del IL-10Rβ para su uso en la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una respuesta de fase aguda, en el que dicha IL-TIF/IL-21 se selecciona entre:

- 35 (a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID N°: 40, SEC

ID N°: 41 y SEC ID N°: 43; o

(b) un polipéptido que tiene una identidad en aminoácidos de al menos el 60% a un polipéptido de (a).

[0102] En una forma de realización adicional, la invención proporciona un
 5 procedimiento para la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda *in vitro* que comprende la puesta en contacto de una célula susceptible a la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda con un anticuerpo antagonista que se une específicamente a una molécula IL-10R β en una cantidad suficiente para inhibir la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda, en
 10 la que dicha IL-TIF/IL-21 se selecciona entre:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 y SECT ID N°: 43; o

(b) un polipéptido que tiene una identidad en aminoácidos de al menos el 60% a un polipéptido de (a);

15 y en la que dicha proteína de fase aguda es amiloide A sérico humano, anti-quimotripsina α 1 o haptoglobina.

[0103] Se describen moléculas de ácidos nucleicos aisladas, que codifican proteínas TIF tales como aquellas con la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 7, 25 ó 26. Alguien
 20 experto en la materia apreciará que la degeneración del código genético facilita la preparación de moléculas de ácidos nucleicos que pueden no ser idénticas a la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 7, 25 ó 26, pero que codifican la misma proteína. Naturalmente, las SEC ID N°^{OS}: 7, 25 y 26 son REALIZACIONES preferidas de esta invención, pero otras REALIZACIONES también son una parte de la
 25 invención. En ella se deben incluir el ADN genómico, ADN complementario, y ARN, tal como ARN mensajero. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas procedentes de otras especies animales, incluyendo otros mamíferos, también son una parte de la invención. Además se describen moléculas de ácidos nucleicos aisladas cuyos complementos se hibridan con las SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, o SEC
 30 ID N°: 25 o SEC ID N°: 26 en condiciones rigurosas. "Condiciones rigurosas", como se usa en el presente documento se refiere, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en tampón (3,5xSSC), 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de seroalbúmina bovina, NaH₂PO₄ 25 mM (pH 7), 0,1% de SDS, EDTA 2 mM, seguido de un lavado final en 2xSSC, a temperatura ambiente y a continuación en
 35 0,1xSSC/0,2xSDS a temperaturas tan elevadas como, por ejemplo, 65°C. También se

pueden usar condiciones más rigurosas, tales como 0,1xSSC. Estas moléculas de ácidos nucleicos codifican proteínas de 17-22 kDa aproximadamente determinado por SDS-PAGE, que activa las proteínas STAT, tales como STAT1, STAT3 y/o STAT5. En la forma glicosilada, estas proteínas pueden abarcar entre 17 aproximadamente y 30 kilodaltons aproximadamente, determinado por SDS-PAGE. También se describen moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican proteínas que tienen una identidad en aminoácidos de al menos el 30%, preferentemente de al menos el 45%, más preferentemente de al menos el 60%, y lo más preferentemente del 90% con una secuencia de aminoácidos de una proteína codificada por las SEC ID N°: 7, 25 ó 26, por ejemplo, la SEC ID N°: 42.

[0104] También se describen vectores de expresión que incluyen moléculas de ácidos nucleicos, unidas de manera operable a un promotor, para así facilitar la expresión del ADN. Está dentro de las competencias del facultativo preparar esos vectores.

[0105] Los vectores, así como las moléculas de ácidos nucleicos *per se*, se pueden usar para preparar células recombinantes, ya sean eucariotas o procariotas, en las que se incorpora un vector de expresión o la propia molécula de ácidos nucleicos. Las células de *E. coli*, células COS, células CHO, etc., son todos ejemplos de tipos de células que se pueden usar.

[0106] Las proteínas codificadas por las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente, preferentemente en forma aislada, son otra característica descrita. Por "proteína" se quiere decir tanto el producto de expresión inmediato de las moléculas de ácidos nucleicos, como sus formas glicosiladas, así como las formas multiméricas, tales como dímeros, trímeros, etc., que pueden contener al menos una molécula proteica de la invención, y al menos una molécula proteica diferente. Preferentemente, esta molécula proteica diferente es una citocina, tal como IL-10. También se incluyen construcciones, tales como proteínas de fusión, donde todas o parte de las proteínas descritas anteriormente están unidas de alguna forma, tal como en una proteína de fusión, al menos una proteína o péptido adicional, o una secuencia de aminoácidos. El "compañero de fusión" puede ser, por ejemplo, una molécula que proporciona una señal reconocible, ya sea directa o indirectamente, tal como un péptido FLAG, β -galactosidasa, luciferasa, etc. Estos compañeros de fusión preferentemente están unidos a la molécula que se ha descrito anteriormente por los N- y/o C-terminos de la proteína; no obstante, se debe entender que hay muchas técnicas conocidas para la unión de moléculas a aminoácidos, y todas y cada una de estas

metodologías pueden producir construcciones.

[0107] Las moléculas de proteínas individuales, como se ha indicado anteriormente, preferentemente tendrán un peso molecular de entre 17 aproximadamente y 30 kilodalton aproximadamente, determinado por SDS-PAGE. En 5 las formas multiméricas, naturalmente el peso molecular del complejo variará, pero las moléculas TIF contenidas en él tendrá cada una un peso molecular de 17 a 30 kilodalton aproximadamente, determinado por SDS-PAGE.

[0108] Las proteínas preferentemente constarán de al menos 120 aproximadamente y no más de 200 aminoácidos aproximadamente. Preferentemente, 10 las secuencias de aminoácidos constan de o comprenden todas o parte de las secuencias de aminoácidos codificadas por las SEC ID N^{OS}: 7, 8, 9, 25 ó 26. Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos contiene todos, excepto aproximadamente los primeros 40 aminoácidos codificados por dichas SEC ID. Incluso más preferentemente contiene todos excepto aproximadamente los primeros 20 15 aminoácidos codificados por estas secuencias. Más preferentemente, la proteína comprende los aminoácidos expresados en las SEC ID N^o: 40 ó 41, así como proteínas definidas por las identidades de aminoácidos expuestas anteriormente.

[0109] El facultativo experto apreciará que las proteínas codificadas por las moléculas de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente son una característica de la 20 invención, y se pueden usar para producir anticuerpos, de acuerdo con protocolos habituales. Esos anticuerpos, en forma monoclonal o policlonal, constituyen una característica adicional de la invención, al igual que los fragmentos de dichos anticuerpos, las formas quiméricas, las formas humanizadas, las formas recombinantes, etc. Además, una característica de la invención son los inmunógenos, que comprenden 25 todas o parte de la secuencia de aminoácidos de las moléculas proteicas de la invención, preferentemente combinadas con un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund. Se pueden unir porciones de las secuencias de proteínas a otras moléculas, tales como la hemocianina de lapa de California, para hacerlas más inmunógenas. Estos anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, para 30 determinar si están presentes las proteínas descritas.

[0110] Los datos expuestos anteriormente, en particular, la inducción de la expresión de la molécula de la invención por el LPS, y la regulación de la respuesta de fase aguda por esta molécula, indican que las moléculas de la invención están involucradas de forma activa en la respuesta inflamatoria. Será evidente para el 35 facultativo experto que la IL-TIF/IL-21 puede regular la respuesta inflamatoria. Véase,

por ejemplo, Janeway, y col., Immunobiology (4th edition). Janeway explica que diversas citocinas tales como la IL-1, IL-6 y el TNF- α activan los hepatocitos para sintetizar proteínas de fase aguda, tales como la proteína C reactiva, y lecitina de unión a manano, así como aquellas descritas en los ejemplos, anteriormente.

5 **[0111]** El papel de la IL-TIF/IL-21 en la activación de proteínas de fase aguda también da lugar a un procedimiento para la identificación de agonistas y antagonistas de la IL-TIF/IL-21, determinando si la producción de proteínas de fase aguda varía en presencia del agonista o antagonista putativo, y la IL-TIF/IL-21. Un incremento en la producción se debe tomar como indicación de que la molécula de prueba es un
10 antagonista, y viceversa.

[0112] La invención incluye procedimientos para regular la actividad de la IL-TIF/IL-21 en vista de sus relaciones con los receptores de la interleucina-10. Como se ha mostrado anteriormente, el uso de antagonistas del IL-10R β , tales como anticuerpos, inhiben la actividad IL-TIF/IL-21.

15 **[0113]** Se describe el uso de agonistas y antagonistas de receptores de IL-10, tales como agonistas, y antagonistas del IL-10R β para regular la producción de IL-TIF/IL-21.

[0114] Otras características de la invención serán evidentes para el facultativo y no requieren mayor explicación.

20 **[0115]** Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos descriptivos, y no limitantes.

[0116] Los siguientes párrafos describen características de esta descripción.

1. Un procedimiento para modular la actividad de una molécula IL-TIF/IL-21, que comprende la puesta en contacto de una célula susceptible a la actividad IL-TIF/IL-21
25 con un modulador IL-TIF/IL-21, en una cantidad suficiente para modular la actividad IL-TIF/IL-21.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho modulador es una sustancia que se une a moléculas IL-10R β .

3. El procedimiento del párrafo 2, en el que dicho modulador es un anticuerpo que se
30 une específicamente a una molécula IL-10R β .

4. El procedimiento del párrafo 3, en el que dicho modulador es un antagonista de una molécula IL-10R.

<110> Dumoutier, Laure

35 Renault, Jean-Christophe

<120> Isolated Nucleic Acid Molecules which Encode T Cell Inducible Factors, or Interleukin-21, The Proteins Encoded, and Uses Thereof

<130> LUD 5664

<140>

5 <141>

<150> US09/419.568

<151> 18-10-1999

<150> US09/354.243

<151> 16-7-1999

10 <150> US09/178.973

<151> 26-10-1998

<160> 43

<210> 1

<211> 24

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<400> 1

agcactctcc agcctctcac cgca 24

20 <210> 2

<211> 12

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

25 <400> 2

gatctgcggt ga 12

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

30 <213> Mus musculus

<220>

<400> 3

accgacgtcg actatccatg aaca 24

<210> 4

35 <211> 12

<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>
<400> 4
5 gatctgttca tg 12
<210> 5
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus <220>
10 <400> 5
aggcaactgt gotatccgag ggaa 24
<210> 6
<211> 12
<212> ADN
15 <213> Mus musculus
<220>
<400> 6
gatcttcct cg 12
<210> 7
20 <211> 1119
<212> ADN
<213> Mus musculus <220>
<400> 7

```

taaacaggct ctctctcac ttatcaactg ttgacacttg tgcgatctct gatggctgtc 60
ctgcagaaat ctatgagttt ttcccttatg gggacttttg ccgccagctg cctgcttctc 120
attgccctgt gggcccagga ggcaaatgcg ctgcccgtca acacccggtg caagcttgag 180
gtgtccaact tccagcagcc gtacatcgtc aaccgcacct ttatgctggc caaggaggcc 240
agccttgagc ataacaacac agacgtccgg ctcatcgagg agaaactgtt ccgaggagtc 300
agtgtctaaag atcagtgcta cctgatgaag cagggtgtca acttcaccct ggaagacgtt 360
ctgtccccc agtcagacag gttccagccc tacatgcagg aggtgggtacc tttcctgacc 420
aaactcagca atcagctcag ctctgtcac atcagcgggtg acgaccagaa catccagaag 480
aatgtcagaa ggctgaagga gacagtgaag aagcttggag agagtggaga gatcaaggcg 540
attggggaac tggacctgct gtttatgtct ctgagaaatg cttgcgtctg agcgagaaga 600
agctagaaaa, cgaagaactg ctcttctctg ccttctaaaa agaacaataa gatccctgaa 660
tggacttttt tactaaagga aagtgaagaa ctaacgtcca tcatcattag aagatttcac 720
atgaaacctg gctcagttga aaaagaaaat agtgtcaagt tgtccatgag accagaggta 780
gacttgataa ccacaaagat tcattgacaa tttttattg tcatgatga tacaacagaa 840
aaataatgta ctttaaaaaa ttgtttgaaa ggagggtacc tctcattcct ttagaaaaaa 900
agcttatgta acttcatttc catatccaat attttatata tgtaagtta tttattataa 960
gtatacattt tatttatgtc agtttattaa tatggattta tttatagaaa cattatctgc 1020
tattgatatt tagtataagg caaataatat ttatgacaat aactatggaa acaagatatc 1080
ttaggcttta ataaacacat ggatatcata aaaaaaaaa . 1119

```

<210> 8

<211> 7445

<212> ADN

5 <213> Mus musculus <220>

<400> 8

```

gtctatcact tgcttaagat tcttctaatt tataaaaaaa actatttctt aaaatgaaa 60
gcaaacagag cacgtattta tagcatggtg ttctgacat gcaggtagag agtgggaatgg 120
taagaggcgc tattatcagc attaaccaac atgttaatgt tttcttcttg caagcaaaact 180
tgaaatctat gtcttaaca atcttcaagc ctctaataa gtgctaacga ctggagtccg 240
ctgctgtcca acagagctct tgagcacgct ctctctgtt tgcaatttta tgttctttga 300
tcgactcccc aaactctcac cttcggtccc tgatggccac ctttcaactt tctgcattta 360
tgaactccat gttttaatct ttttattaaa atattcacac aatcagtgtt tgtgcaagtc 420
tgtttcaccc acatgtatgt ctgtgcacca agtctgcct ggtgcttggt ggggcaagga 480
gcaggagagg gtgccctggc accggagtca cggatggttg tgagccacca tgaggatgct 540
gggagttaga cccaggctct ccagaagtgc agcaaatgct cttaaccaca cgcaggcatt 600

```

tctctctcca gccccaacat gagtgccttt agattccacc tagaatagag atctgatggc 660
ttcactcact gccacctccc ctttgcactt ttctgccaag gaacacccaaa aagcaagaat 720
ccccacactg ctttcgctcc tcaagtctgc acctctcaac aggtcaagat tctccagtgt 780
ccctctaaca ctttccccag gtccctctta acactttctc cagtgtccct ctaacacttt 840
ctccagtgtc cctctaacac ttttgatctc aattagctga ggggagaaag atctcacaca 900
gtgattttca tgacttcgcg ttctagtcta gatgtaggca tttgcgtgtc agtctaggg 960
aggcgtctgc tcccgtgtt taggaaagac tttcctagtc tagttgtcag gtgctatctg 1020
ggattcagtg tacatacaat gcaaaaaatc ccagtatttt gtaaattctc ttcttcaact 1080
atccatctat atagtatgtt attgtaggct catttaaaaa taatattttg agacttatgc 1140
ttgcacaagt aaaatgtcag agaattagca aatgtatagt attattttat tttaaaaaaa 1200
tctatgctta aaatgtctat tagattgttc actaccgata tttccaaact taacttgacc 1260
ttggctatga tttcaacctt tgtatttgca tctaccataa cagtctctga accagaacat 1320
tctgtggcaa tgggagctgt gaagaaagcc aacattctta ttaaaaaaaa aaaacagcta 1380
gttatagttt,aggattccat atactaaaaa aaatagagat ataattattt taaaaattga 1440
aataatctcc aagttttcat tatggcttat ttcaaagcac agaatatagg acacgggtct 1500
tttatttctg gtcacttcta aagagataag aatctatgaa gttggtggga aaatgagtcc 1560
gtgacccaaa cgctgactca atagctacgg gagatcaaag gctgctctac tcaatcagaa 1620
tctactacgg caaagccatg gctttctttg aaaaccgtgt ttagaagatt tctgggattt 1680
gtgtgcaaaa gcacctgtt ggccctcacc gtgacgtttt aggggaagact tcccatctct 1740
caagggtggga aggcttgag gtggtgtctt gtggcctcct atggtgggta ggtacttctc 1800
agaagacagg actggaaatt agataatgtc tgatgtcata tcattcaciaa taccacaaaa 1860
accctggtgt cccgatggct ataaaagcag caacttctgc ctctcccatc acaagcagag 1920
acacctaacc aggtgaagcac tcagacctct acagacaatc atctgcttg taccatgcta 1980
cccacgaac atgctcccct gatgtttttg ctttttgctc tctcactaac aggtctctct 2040
ctcacttctc aactgttgac acttggtgca tctctgatgg ctgtcctgca gaaatctatg 2100
agtttttccc ttatggggac tttggccgcc agctgcctgc ttctcattgc cctgtgggcc 2160
caggaggcaa atgcgctgcc cgtcaacacc cgttgcaagc ttgaggtgtc caacttccag 2220
cagccgtaca tcgtcaaccg cacctttatg ctggccaagg aggtacagct gcatctcttt 2280
ctctccatac cgccttgcca ttttctctga agcacttgca aactctttag gggcgcttta 2340
tctccgcagg tctcactacc tatgttttct gtctctttag agactcttta aggactgggt 2400
ctttttctat ttctatttca aggtctcagg accatttcct atcttggcct tcaggacaca 2460
tatactgaat ttatctaca gaggcgcatt tagaaagcca cccacgactg caatactttc 2520
catttctctg tgctctcttc tgaactcata ctctcttggc tactcctgag acccactgcg 2580
gacatacatc tctacttaca ggcttttctt ccactctctt gtcaccaggg cacttaggg 2640
tttctctctt tcaggccagc cttgcagata acaacacaga cgtccggctc atcggggaga 2700

aactgttccg aggagtcagt gtaagtcctc actgtgatga gcagggctag ctgcgggagc 2760
tggtggaccc tctgggatag tctgacgtat gacccctgct gcttcttgct tacctgcagg 2820
ctaaagatca gtgctacctg atgaagcagg tgctcaactt caccctggaa gacgttctgc 2880
tccccagtc agacaggttc cagccctaca tgcaggaggt ggtacctttc ctgaccaaac 2940
tcagcaatca gctcagctcc tgtgtaagtc tgactctggc tacctatgct cctctctctt 3000
cctcttctat tccagtaaga acccgaggtc ctgccctctc tctcttcaca agagtgagga 3060
gggcctcagc accaccacca tcataggcca ctgaaatag gtcacaaagg ctttggtctc 3120
aattgagtaa tactttgagt ttgtatgagt gaagctttat ttgttttatc catggaaaga 3180
aatcaactca aattctgtag gatgagaaag atgttgggaa cgaaaaaagg cctagataga 3240
gaaacagatc tgctgagtat agtacttatg gggggagcag ggggcgatat ccactgagta 3300
caagtacttg tggggagaga aatccactga gtacaagtac ttgttgcat ggagatccac 3360
tgagtacaag tacttgtggg gggagggaaat ggcacagagc aaaagttgaa gggaaggaa 3420
atggagaggc ctcattggtg ggggtgtgaa aggtcactcc ttttccatgt gatggagagt 3480
taagaaaaac .cagtgtgtga gttttagtgc ttcagacacc cccaactatg aaacatatcc 3540
acgaggagcg ggcagactgt gggagacctg gcatttaggg aaggcgcggc ttttcacacg 3600
agaaacttta tgctcatctc ttgtgctaca ctcccacctt tgatgaggtt cagctcaggt 3660
ttcgtttcta ccgttcttgc tactggtgga aacttcagta ggattcccca aagacgagga 3720
cagctcttct gtaaggagg gacctggatt tcagtgtcct agagaacgaa atagctcaga 3780
gaatctaggt caacgtgaaa tctaggtcac agcgggcaaa aatgactgaa cgcctctatt 3840
ccagggtgaa ggtcacgtgc ctcagatata ctgaggtatt gggctccac cggataagat 3900
tctgttagtg agtctgcttt tattttgcag cacatcagcg gtgacgacca gaacatccag 3960
aagaatgtca gaaggctgaa ggagacagtg aaaaaggtag tattggcaag ccacaatact 4020
aagccattca gtaggagacg tggggatttc tttctctgct tcccagtcct ttctactttg 4080
taacatttta tttgacttgt ctactatctg gtccattact cgcttagctg cacctgtatc 4140
tagctgggtc .tatagatctt tcaatctgtg tctaaatttg taagtcacaa ttctggagct 4200
agcagaaagc ttagctcagc cagtctcatg agcacttgct cggaggatgg cttgtgacag 4260
agtcaatgct agaagacagc atccctgatt cccagctctg cacttgccca gtggccatgt 4320
gtaattactt tggcttgatt aagtatttg gaaagccagt tcccacggac ctacataatc 4380
tgaagaacca tgcattgaaa actagaaagc tgggcacaaa cttactagag atgatttttg 4440
agctcattaa acggatgctc tgaaatgtgg caaaatcaac ccagaataac aacaaaagag 4500
ctggatttgc aaataggaca agtattttaga atcactggta ttaatagcta tcatcttaat 4560
taaaatatag ggcctatata tatatttaag attaaacaca agagtggata gcctcccaat 4620
ttacttggcc tggtttcaaa agagtaaaaa tatcagtcac ggattaatta tagtgtcatg 4680
aaagtatgag atggaaaccc tttccttact ttttaccttc atttcttagt ttttttttcc 4740
ttcacacct gatcaagcca ctagtaagca cctatctgct gtgagctatt atatgacttt 4800

acagcaaaca acattgctgt gtggcctctt tggggaaggg aacaggatag caggaggctc 4860
 aggctagcaa gtctgacttg ccctaaagcc agaggcatgg ttgatagcag agaaagtgag 4920
 gctcttcgca agtgggtgtg ctttaagtaat cagaaacagg aaggctccgg ttgatggaat 4980
 tatcagtaag atatctaccc ttatctcctt ctatcgaacc taaatcgtct ctttttcttg 5040
 tgtgtaggct gataaacaca cttgttttct tttgagtgtt catggctttg tagattttta 5100
 gtgctctgcc agttcttggt agagggtttg ttaccttgac acctgggctt ggatgttagc 5160
 atgccaaagg cacacacttc tgaatgcctg tgtaaaagggt tattattcat ttactttgtc 5220
 tttggaaagg tgaagcgtgt gtgagaaaga actcacagga gatgtgttct ctgtaggaaa 5280
 actttttttt tccccttaaa tgcctataat ccactttcag tcaactttga cttttatacc 5340
 atgctgtcac atgaaagagt gtttaggccc gctctcatgg ctctgggaaa agcaccaata 5400
 ggggaaggaa tggtatgctg agaaatctga cgggcaggga aactggtcag agctccccg 5460
 aagaccacca cagggtgtta gtaggaacag tccagggtgg gctcatgtaa tagaatggaa 5520
 cagagcgagg gaagataagc tacaaagttt catagggtec ggagtcttaa agatacaaaa 5580
 tagctgcttg ggcttcataa caaaggaagt ctgggaaggc agcaagtgag agggaaatgg 5640
 aaagggaaaa aacagaatgt agaggacttg aacagctaca aatcctctac cagacgattt 5700
 ttcttggaac aatctagaag gtagtggatt aggtgattgc agggggactt gctttgccat 5760
 ttgaatctgg gtttttgtct ctccattgag gttgaaagcg tcaccctttt taccctcgaa 5820
 tggaggagga aagaaggggt gttatgactc ctacctggag ttttactagt ttacgcaatg 5880
 gaacagacac tcgggacctc ctcttgacaa aaaaaatgga aacctgttgt ttgtcttgtt 5940
 tggtcttttg ttaagaaagc acaggcaaag cccgaccaca tgggttgaat gtgggtcttt 6000
 gagtcaaggc ttttgagttg agcactcatc aatagttgat catggtcagg tggagggcta 6060
 cctgtcaggc cgagccctgc tggcttcgca cttaacatct ccaggctca gtatcacttc 6120
 ctgctactta gcacagttag gagttgagca aacctttttt tccaaccccc actaaaattt 6180
 aattgacaaa agactgtgta atttgtggga tacagtgtga taattgatct atgtgtgcat 6240
 tgtgcaaggt tcaataagat agattaatag gcccatcaac agctttatgg gtgtgaaatg 6300
 caagtaatat aggtagatgc ctgtggtgtc cttaggtcag aaaggcatga ttttaaggtc 6360
 ttgggcaaat catattatac tcatgctaaa aatacattat gttgattatt aatcttttag 6420
 agaaggctga tacttggttt tgggtgctcag caagcaaatg tcaccagctc tttctaactg 6480
 gtaccacttt agaaaatgct acctgtgctc aaattgggtt gtattcttat tttcatagct 6540
 tggagagagt ggagagatca aggcgattgg ggaactggac ctgctgttta tgtctctgag 6600
 aaatgcttgc gtctgagcga gaagaagcta gaaaacgaag aactgctcct tcctgccttc 6660
 taaaaagaac aataagatcc ctgaatggac ttttttacta aaggaaagtg agaagctaac 6720
 gtccatcatc attagaagat ttacatgaa acctggctca gttgaaaaag aaaatagtgt 6780
 caagttgtcc atgagaccag aggtagactt gataaccaca aagattcatt gacaatattt 6840
 tattgtcact gatgatacaa cagaaaaata atgtacttta aaaaattggt tgaaaggagg 6900

```

ttacctctca ttcctttaga aaaaaagctt atgtaacttc atttccatata ccaatatttt 6960
atatatgtaa gtttatttat tataagtata cattttattt atgtcagttt attaatatgg 7020
atttatttat agaaacatta tctgctattg atatttagta taaggcaaat aatatttatg 7080
acaataacta tggaaacaag atatcttagg ctttaataaa cacatggata tcataaatct 7140
tctgtcttgt aatttttctc cctttaatat caacaatacc atcatcatca tcattaccca 7200
atcattctca tgatttcatg cttgacccat attatactgt taaagttggt tcctggaggc 7260
ctgtggtttt gtgtgtgttg tgtgtgtgtg tggggttatg catgtgaaag ccagagatgg 7320
atattagggtg ttcttctcta tcagtctttg cttattatt tgagacaggg tctgtcactg 7380
aacctgtagc taggctggcc aacaagctct attaatattt tttaagatta attaattatg 7440
tgtat 7445

```

<210> 9

<211> 1111

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<400> 9

```

aacaggctct cctctcagtt atcaactttt gacacttggt cgatcgggtga tggctgtcct 60
gcagaaatct atgagttttt cccttatggg gactttggcc gccagctgcc tgcttctcat 120
tgccctgtgg gcccaggagg caaatgcgct gcccatcaac acccgggtgca agcttgaggt 180
gtccaacttc cagcagccgt acatcgctcaa ccgcaccttt atgctggcca aggaggccag 240
ccttgagat aacaacacag acgtccggct catcggggag aaactgttcc gaggagtcag 300
tgctaaggat cagtgtctacc tgatgaagca ggtgctcaac ttcaccctgg aagacattct 360
gctccccag tcagacaggt tccggcccta catgcaggag gtggtgcctt tcctgaccaa 420
actcagcaat cagctcagct cctgtcacat cagtgggtgac gaccagaaca tccagaagaa 480
tgtcagaagg ctgaaggaga cagtgaataa gcttgagag agcggagaga tcaaagcgat 540
cggggaactg gacctgctgt ttatgtctct gagaaatgct tgcgtctgag cgagaagaag 600
ctagaaaacg aagaactgct ccttcctgcc ttctaaaaag aacaataaga tccctgaatg 660
gactttttta ctaaaggaaa gtgagaagct aacgtccacc atcattagaa gatttcacat 720
gaaacctggc tcagttgaaa gagaaaatag tgtcaagttg tccatgagac cagaggtaga 780
cttgataacc acaaagattc attgacaata ttttattgtc attgataatg caacagaaaa 840
agtatgtact ttaaaaaatt gtttgaaagg aggttacctc tcattcctct agaagaaaag 900
cctatgtaac ttcatttcca taaccaatac tttatatatg taagtttatt tattataagt 960
atacatttta tttatgtcag tttattaata tggatttatt tatagaaaaa ttatctgatg 1020
ttgatatttg agtataaagc aaataatatt tatgataata actatagaaa caagatatct 1080
taggctttaa taaacacatg aatatcataa a 1111

```

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<220>

<400> 10

ctgectgett ctcattgccc t 21

<210> 11

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<400> 11

15 caagtctacc tctggtctca t 21

<210> 12

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 5 <400> 12
 gacgcaagca ttctcagag 20
 <210> 13
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <400> 13 atgtatttcc,cagaaa 16
 <210> 14
 <211> 17
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <400> 14
 ccttttctgg gaaatac 17
 20 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 25 <400> 15
 aggtgctcaa cttcaccctg ga 22
 <210> 16
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Mus musculus
 <220>
 <400> 16
 ccactctctc caagctttt ca 22
 <210> 17
 35 <211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<400> 17

5 caagtctacc tctggtctca t 21

<210> 18

<211> 418

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<400> 18

agaagtgctg ttccctcaat ctgatagggt ccagccttat atgcaggagg tgggtgccctt 60
cctggccagg ctcagcaaca ggctaagcac atgtcatatt gaaggtgatg acctgcatat 120

ccagaggaat gtgcaaaagc tgaaggacac agtgaaaaag cttggagaga gtggagagat 180
caaagcaatt ggagaactgg atttgctggt tatgtctctg agaaatgcct gcatttgacc 240
agagcaaagc tgaaaaatga ataactaacc ccctttccct gctagaaata acaattagat 300
gccccaaagc gatTTTTTTT aaccaaaagg aagatgggaa gccaaactcc atcatgatgg 360
gtggattcca aatgaacccc tgcgttaggt acaaaggaaa ccaatgccac ttttgttt 418

<210> 19

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<400> 19

tggccaggaa gggcaccacc t 21

20 <210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

25 <400> 20

cctatcagat tgagggaaca g 21

<210> 21
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <221> cebador
 <222> 24,25,29,30,34,35
 <223> n es inosina en todos los casos
 <400> 21
 10 ggccacgcgt cgactagtagt gggnnngggnn gggng 36
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial <220>
 15 <400> 22
 ggccacgcgt cgactagtagt 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <400> 23
 ccttccccag tcaccagttg 20
 <210> 24
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <400> 24
 30 taattgttat tcttagcagg 20
 <210> 25
 <211> 690
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35 <220>

<400> 25

```

    tgcacaagca gaatcttcag aacagggtct ccttccccag tcaccagttg ctcgagttag    60
    aattgtctgc aatggccgcc ctgcagaaat ctgtgagctc tttccttatg gggaccctgg   120
    ccaccagctg cctccttctc ttggccctct tggtagagg aggagcagct gcgcccacatca  180
    gctcccactg caggettgc aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc aaccgcacct   240
    tcatgctggc taaggaggct agcttggtg ataacaacac agacgttcgt ctcatgggg    300
    agaaactgtt ccacggagtc agtatgagtg agcgtgcta tctgatgaag cagggtgctga   360
    acttcaccct tgaagaagtg ctgttcctc aatctgatag gttccagcct tatatgcagg   420
    aggtggtgcc cttcctggcc aggctcagca acaggctaag cacatgtcat attgaagggtg   480
    atgacctgca tatccagagg aatgtgcaaa agctgaagga cacagtgaaa aagcttggag   540
    agagtggaga gatcaaagca attggagaac tggatttgct gtttatgtct ctgagaaatg   600
    cctgcatttg accagagcaa agctgaaaaa tgaataacta acccccttct cctgctagaa   660
    ataacaatta gatgccccaa agcgattttt                                690

```

<210> 26

5 <211> 4797

<212> ADN

<213> Homo sapiens <220>

<400> 26


```

tgcacaagca gaatcttcag aacaggttct ccttccccag tcaccagttg ctcgagttag 60
aatgtgtctgc aatggccgcc ctgcagaaat ctgtgagctc tttccttatg gggaccctgg 120
ccaccagctg cctccttctc ttggccctct tggtagaggg aggagcagct gcgcccacatca 180
gctcccactg caggcttgac aagtccaact tccagcagcc ctatatcacc aaccgcacct 240
tcatgctggc taaggaggta tacatctcaa tcctgctctt tctcgttgga tctacttgga 300
atccaaatag ttcttaaaact tttcttcaga gcattctctaa gagctttagg aaccactgt 360
ttatccctga gggtagataa attttctggt ttttcagaga ctcttttgga atctggcttt 420
ttttttttct tgaacttctt ccttccattt tggcctttat gatacatatg atgaattttt 480
cccaaagagc ggccattcag taatccatct gatgattttt ttttccctta tgcctctgtg 540
cattgttcta aactcatgca cacatctgaa ttctgctttt agtctttatg atgttgctct 600
ggggagacgg gatggggcac atgtctatgt ataaattttt tttctatttg ctcaatgtcc 660
agacccttag tcttttcttc tcttccaggc tagcttggtt gataacaaca cagacgttcg 720
tctcattggg gagaaactgt tccacggagt cagtgtgagc tacagttgtg acgaacaggg 780
ccgtgtgccg tccatgggta cttgggggtg tggtagatgat ggtttaggtc ttatccctta 840
tgaccctttc tgtttccctt ccacctgcag atgagtgagc gctgctatct gatgaagcag 900
gtgctgaact tcacccttga agaagtgtg ttccctcaat ctgatagggt ccagccttat 960
atgcaggagg tggtagccctt cctggccagg ctgagcaaca ggctaagcac atgtgtaagt 1020
tcagctctca gcctatgcc acctaccctt ccttccctcc ttccacagag acccccttac 1080
cccaactctc tctccttccc cctaccctta agctagcagg aagaagtgtc ttggcagcag 1140
tgttatcagg agtcatttgg gatcatagag tatttgcttt tgctttgact gagtcaacac 1200
ttgagtttat agtgggtgaat ggggtctgga acttaagtgt acagaagccg cattggtttg 1260

```

tcttcggaaa aaaggcaact caggttgctg aagatgagaa aggtgttggg aaaacatcta 1320
 gctgtggaaa tggatccatt gagtctaagt tgttgagggg aggggatggc atggagagaa 1380
 attagaagag aaagtgggaa atgggaaggc ttaaagtcgg tgggtgggtcg gcagactgtt 1440
 gccctgttga tgtcatggga agccacaaaa tcggaggcgt gtgaacttga tgccgctgaa 1500
 catttgaaac tatgaaaaaa agtttgagtg gagtggggcc agtaaaaggc cctaggactt 1560
 actgaagagg gcttaathtt cacatgagat gttttatgta cttttcttgt tctaagcatg 1620
 caatthttctg gagatacgat tgaggthtta ttccttacag aatttgcata aactactccg 1680
 ctctttccac aaatgcaaac cttagtagga tttcccaaag atgaagagag gtctcttgta 1740
 aggggaagtga ctggattctg gcgtccaagg gaattcaaga gtcaggaaa tctaggtcac 1800
 tgttgaaatc taggtcattg tgggcaaaat tactaagagc tttaattcca ggtgaattgt 1860
 actgtacctc catgggtgtg gaggttcata aagtttcagc acaacattaa gatagttatg 1920
 ctgtgtattg ttttatagca tattgaagggt gatgacctgc atatccagag gaatgtgcaa 1980
 aagctgaagg acacagtga aaaggttagga ctgataactg tcaatgctaa gtcattgcaat 2040
 aggagagaca aatgttgtht tcttttctt tctttcttcc catcactttg tgatttttca 2100
 ctgtattctc ctaccaccag ggcgattact ttggtgtctg tgtatgtaga tatatctata 2160
 tatctagatg tcagthttcca aatcttgcaa attgtagaat tctagaactg gttgggatct 2220
 tagcttgtct agtcacataa cctcagattc tggggatggt cagtggcaga gatagggtca 2280
 gaatgcaggt ctctgaatc ccaagccagc acttttcccg gtggtgatac agattagtht 2340
 tggtagcatt aattcttagg gaaatttcag attcctattg actcatgtaa tctgaagaag 2400
 tacttgthta aaaacagaaa aatgcctatg ggcaaattta tttgaagtca tttttgaagt 2460
 cattaatgca ttgctttgaa acttgggaaga ataaactcag aacaatgaga aaagagctgg 2520
 acttgcatat agggctaatt tctggagtaa taaacactta ttttgaaata tcataatatc 2580
 tatcagatat tgattatagt ttaaaagcaa gagcagacaa ccccgatctc ttttatacag 2640
 gttcaaatag agtaaaaaata ttagtaagag atttattata gttaaatgga agtctgaatt 2700
 ggtaagcttt tttttcttcc tctctcccat caagacctc cattctagtt tcttcttca 2760
 ctccctcaac aaatccctag ggagcattta tccatggtgg gctggtgtac atttctatag 2820
 tgaatgatac catcatgtgg cctatttggt gaaaagaaca acaatggaag gcttagacta 2880
 acaatagtga ctaccccaa aaccggagga atgattagga gcagtgaag tgacgtctt 2940
 gcaagcaggt acaactaaat actcagaaac atgaaggctc cagttgatgg aattttcagt 3000
 aacaagctta accttaattc ccccttttcc cctcttgact ttttaaaaaa gcgtttcttc 3060
 ctgagcatca tttaatgagt gtgactgttt ctctcttga taattgaagg cttttagatt 3120
 ttaaattgtg aagcccagtt ctctgttat agaactatta tctagacatg gagggctgaa 3180
 tgttagcatg ccacagacaa ggcattgctt acacatcttg cttaaaaaat tactgatttc 3240
 atcttgcttg ttgtcttag aaaagtgaag tgtgagagag gagaatctca tgggtgatctg 3300
 tgtgattttc aagacctta atccattttg aaagaatcaa tttcatattt gcaatgggtt 3360

```

gccatgtgga agagtgatta tgcttttttg ctggtagctt cagaaagcac aggagggaga 3420
gcaatgttgt tcagagaaag atcaacagga ggagaaactg tcagagctgt ctgaaatagg 3480
gtggtttttg gaggcattaa ttccctctcg ttgggggtaa aagcagaacg caggttggta 3540
gtaaaatgca tgacagacag taggggacga taaactttaa aattctttat agtcttgag 3600
tctttgagat agaaaagaat atcttttttg ccttatgtca aaagaagtat ggaaaggatga 3660
aagggcggaa gaaagcagga aaaggaagaa ccatgtatta tatagaggac aatggtgaca 3720
aggtttttct tgaaataatg caaatatgat agattagagg aatttcagta gggaatgctt 3780
ttcacttgaa tttgggtttc ctcttcgatt aagtttgga tcctcatctg catttgactt 3840
ggagagagaa agaatgaatg ttaggacctt tatctggttt tctattaact aaagcaagt 3900
gaaaagactt atttggtatt tttcccacaa aagtgaaac ttttctttta ctgtttgtca 3960
aaaagggtgga aatagaaaaa gccttaatgt attggtgaat acatggttca aagtcatttg 4020
agtagagatg ttttaaatca ggagtgtcca atcatttggc ttccctggac caccttgaaa 4080
gaattgtctt ggtacacaca taaaatacaa gaacaatagc tgatgagcta aaaaagtcca 4140
tgcataaatc tcatactgtt ttaagaaagt ttatgaattt ctgttagggt gcattcaaag 4200
ctgtcctggg ccatgtgcgg cctgtgggct gcaggttga caagctcctt ataagtaatc 4260
tgtcatagat agttttggag ctgcaaaaca ggccaaggca taatgggtgg cactcgggat 4320
ccccagatc ccagcctcac ttcagtctcc ttgctctggt taagaagggg tgggtcaactc 4380
tctgccagc ttttaaacag cttcattagt gtgaggtgca cctgaaattg atgcctgctg 4440
gtggcctctc agtccagaga gccgtcattt taagctcttt ggcaaatcat acaatactaa 4500
agggatatta ctatgaatgt tttacaaatg cttaaaactc ggtttctgtc tccatcaacc 4560
taatcttgca atttctaatt tgttcacttt agaaaacatg gcataaatgc tcaaatactt 4620
ttgcattctt attttcacag cttggagaga gtggagagat caaagcaatt ggagaactgg 4680
atttgctgtt tatgtctctg agaaatgcct gcatttgacc agagcaaagc tgaaaaatga 4740
ataactaacc ccctttccct gctagaaata acaattagat gccccaaagc gatTTTT 4797

```

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens <220>

<400> 27

atcagatgga ttactgaatg 20

<210> 28

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens <220>

<400> 28
agctcagcta cagcacagat 20
<210> 29
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<400> 29
cctgccccat ttattggcag 20
10 <210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
15 <400> 30
tgtcctctgc caccctaaca 20
<210> 31
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Homo sapiens
<220>
<400> 31
taattcacca ggaccatcat 20
<210> 32
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<400> 32
30 gtggactcag gcaatgatgt 20
<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
35 <220>

<400> 33
acatagagtg ttaaagtggg 20
<210> 34
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<400> 34
gctggaaggt ggacagcgag 20
10 <210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
15 <400> 35
tggcacgtg atggactccg 20
<210> 36
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Mus musculus
<220>
<400> 36
tctgctcct gctcctggga 20
<210> 37
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Mus musculus
<220>
<400> 37
30 tccaggaggt ctgtagtaat 20
<210> 38
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus
35 <220>

<400> 38

ctgcctgctt ctcattgccc t 21

<210> 39

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<400> 39

caagtctacc tctggtctca t 21

10 <210> 40

<211> 179

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <400> 40

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

<210> 41

<211> 179

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<400> 41

5

```

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

Ala Cys Val

```

<210> 42

<211> 5935

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<220>

<400> 42

```

gaattcaagt ccacatgcaa tcaatccgaa tactttgtaa attctcttct tcaaatatcc 60
atctatatag tataagttat ttaggatca tttaaaaata atgttttgag acttatgttt 120
gcacaagtaa aatgtcagag agaattagca aatgtatagt attattttat tttaaaaaat 180
ctatgcttaa aatgtctatt agattgttca ctactgacat ttccaaactt aacttgacct 240
tggtatgat ttcaaccttt gtatttgcac ctaccataac tgtgtgctca cttaccatgc 300
tatccgacga gcatgttccc ctgatgtttt tgccttttgc tctctcgcta acaggctctc 360
ctctcagtta tcaacttttg acacttgtgc gatcgggtgat ggctgtcctg cagaaatcta 420
tgagtttttc ccttatgggg actttggccg ccagctgcct gcttctcatt gccctgtggg 480
cccaggaggc aaatgcgctg cccatcaaca cccggtgcaa gcttgaggtg tccaacttcc 540
agcagccgta catcgtcaac cgcaccttta tgcctggcaa ggaggtagag ctgcatctct 600
ttctctccat accgccttgc catttctctg aagcacttgc aaactcttta ggggcgcttt 660
atctccgcag gtctcactac ctatgttttc tgtctcttta gagactcttt aaggactgga 720
tctttttcta tttctatttc aaggctcag gacpatttcc tatcttgcc ttcaggacac 780
atatactgaa ttttatctac agaggcgcgt ttagaaagcc acccagact gcaatacttt 840
ccatcctgtt gtgctctctt ctgaactcat actctcttgg ctactcctga gaccactgc 900
ggacatacat ctctacttac aggcttttct tccatctcct tgcacccag gcacttaggg 960
tttctctct ttcaggccag ccttgagat aacaacacag acgtccggct catcggggag 1020
aaactgttcc gaggagtcag tgtaagtcct cactgtgatg agcagggcta gctgcgggag 1080
ctggtggacc ctctgggata gtctgacgta tgaccctgc tgccttctgt ctacctgcag 1140

```


gctaaggatc agtgctacct gatgaagcag gtgctcaact tcacctgga agacattctg 1200
 ctccccagtc cagacagggt cgggccctac atgcaggagg tggcgccctt cctgaccaa 1260
 ctcagcaatc agctcagctc ctgtgtaagt ctggctctgg ctacctatgc tcctctctct 1320
 tcctcttcta ttccagtaag aacccgaggt cctgccctct ctctcttcac aagagtggag 1380
 agggcctcag caccaccacc atcataggcc acttgaaata ggtcacaaag gctttggctt 1440
 caattgagta atactttgag tttgtattag ttaagcttta tttgttttat ccatggaaag 1500
 aaatcaactc aaattctgta ggatgagaaa gatgttgga acgaaaaaag gcctagatag 1560
 agaaacagat ctgctgagta cagtacttat gggggggggg ggcagggggc gatatccact 1620
 gagtccaagt acttggtggg agagaaatcc actgagtaca agtacttgtg ggggaaggaa 1680
 tggcacagag caaaagttga agggaaagag gaagatggag aggcctcaat gttgggggtg 1740
 tgaaaggtea ctcttttttc catgtgatgg agagttaaga aaaatcagtg tgtgagtttg 1800
 atgtcttcag acacccaac tatggcagac tgtgggagac ctggcattta ggaaggcgc 1860
 ggcttttcac acgagaaact ttatgctcat ctcttgctgc acactccac ctttgatgag 1920
 gttaagctca ggtttcggtt ctaccgttct tgctactggt ggaaacttca gtaggattcc 1980
 ccaagacga ggacagctct tctgtaaggg agggacctgg atttcagtg cctagagaac 2040
 gaaatagctc agagaatcta ggtcaacgtg aaatctaggt cacagcgggc aaaaatgact 2100
 gaacgcctct attccaggtg aacggtcacg tgcctcagat atactgaggt attgggctcc 2160
 caccggataa gattctgtta gtgagctgc tttattttg cagcacatca gtggtgacga 2220
 ccagaacatc cagaagaatg tcagaaggct gaaggagaca gtgaaaagg tactattggc 2280
 aagccacaat actaagccat tcagtaggag acgtggggat ttctttctct gcttccagtc 2340
 ctcttctact ttgtaacatt ttctttgact tgtctactgt ctgggccatt actcacttag 2400
 ctgcacctgc atctagctgg gtctatagat ctttcaatct gtgtctaaat ttgtaagtca 2460
 caattctgga gctagcagaa agcttagctc agccagtctc atgagcactt gctcggagga 2520
 tggcttgta cagagtcaat gctagaagac agcatccctg attcccagct ctgcacttgc 2580
 ctagtgcca cgtgtaatta ctttagcctg attaagtatt tgggaaagcc aattcccacc 2640
 gacctacata atccgaagaa gcatgcattg aaaactagaa agctgggcac aaacttacta 2700
 gagatgattt ttgagctcat taaactgatg ctctgaaatg tgatcaaatc aaccagaat 2760
 aacaacaaaa gagctggatt tgcaaatagg acaagtattt agaactactg gtattaacag 2820
 ctgtcatctt aattaaaata tagtgtctat ttagctgcct atttaagatt aaacacaaga 2880
 gtggataact tccaattta ctgggcctgg tttcaataga gtaaaaatat cagtcataga 2940
 ttaattatag tgtcatgaaa gtatgagttg gaaaccctt ccttactttt taccttcatt 3000
 tcttagttat tatttttttt tcttcacacc ctgatcaagc cactagtaag cacctatctg 3060
 ctgcgagcta ttatatgact ttacagcaaa caacattgct gtgtggcctc tttggggaag 3120
 ggaacaggat agcaggaggc tcaggctagc aagtctggac tcaacctaaa gccagaggca 3180
 tggttgatag cagagaaagt gaggtctctc acaagtgggt gtgcttaagt aatcagaaac 3240

aggaaggctc tggttgatgg aattatcagt aagatatcta cccttatctc cttcttctat 3300
 agaagctaaa ccgtctctcc ttcttgtgtg taggctgata aacacgcttg ttttcttttg 3360
 agtgttcatg gctttgcaga ttttcagtgc tctgccagtt cttgttagag ggtttgttac 3420
 cttgacacct gggttggtgat gttagcatgc caaaggcaca cacttctgaa tgcctgtgta 3480
 aaaggttatt attcatttac tttgtctttg gaaagggtgaa gtgtgtgtga gaaagaactc 3540
 acaggagatg tattctctgt aggaaaactt ttttttcccc ttaaaagcct ataatccact 3600
 ttcagtcaac tttgactttt ataccatgct gtcacatgaa agagtgttta ggcccgcctc 3660
 cgtggctctg ggaaaagcac caatagggga agaaatgtta tgccgagaaa tctgactggc 3720
 agggaaactg ggtcagagct ccccaaagac cactacaggt gttaagtagg aacagtcgag 3780
 ggtgggttca tataatagaa tggaacagag ggaggggaaga taagctacaa agtttcatag 3840
 ggtcctaagt ctttaagata caaaatagct ggttgggctt cataacaaag gaagtctggg 3900
 aaggcagcaa gcattgagag ggagatggaa agggaaaaaa caatgtagag gatttgaaaa 3960
 gctacaaaac ctccacgaga ggatttttct tggaggaatc tagaacaagg gtgggtggatt 4020
 aggtggatcg cagaaggact tgctttgcca tttgaatctg ggtttttgtc tctccattga 4080
 ggttgagagc gtcacccttt tttaccctgg ataggaggag gaaagaaggg gtgttttgac 4140
 tcctacctgg agttttacta gtttacgcaa tggaacagac actcgggacc tcctcttgac 4200
 aagaaaaaaa aaaaaaaaag gaaacctgtt gtttctcttg tttgttcttt tgtaagaaa 4260
 gcacaggcag ctgggcatgg tggcccatgc ctttaatccc agcatttggg aggcagaggc 4320
 aggtgacttt ctaaattcaa ggccagcctg gtctacaaag tgagttccag gacagccagg 4380
 gctatacaga gaaaccctgt ctcgggaaaa aaaaaaaga agaaaagaaa agaaaagaag 4440
 agaagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag aggagaggag 4500
 aggagaggag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag 4560
 aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaagag aagagaaaag aaaagagaaa 4620
 agaaaagaaa aaagcaagca agcaagcact ggcaaagcat gccacatgg gacgtatgtg 4680
 ggtctttgag acaaggcttt tgaattgagc gctcatcaat agttgatcat ggtcagggtg 4740
 agggctacct gtcaggccga gccctgctgg cttagcactt aacatctcca ggtctcagta 4800
 tcacttcttg ctgcttagca cagttaggag ttgagcaaac ctttttttcc aacccccact 4860
 aaaatttaat ttacaaaagg cagtgttaatt tgtgggatac agtgtgataa ttgatctatg 4920
 tgtgcattgt gcaagggttca ataaggtaga tcaataggcc catcaacagc tttatgggtg 4980
 tgaaatgcaa gtaatatagg tagatgcctg tgtgtcctta ggtcagaaaag gcatgatttt 5040
 aaggctcttg gcaaatcata ttatactcat gttaaaaaatg cattatgttg attatcaatc 5100
 ttttagagaa ggctgatact tggttttggg gctcagcaag caaatgtcac cagctctttc 5160
 taactagtac cacttttagaa aatgctaccc gtgctcaaat tggtttgtat tcttattttc 5220
 atagcttggg gagagcggag agatcaaagc gatcggggaa ctggacctgc tgtttatgtc 5280
 tctgagaaat gcttgctgtc gagcgagaag aagctagaaa acgaagaact gtccttcctc 5340

```

gccttctaaa aagaacaata agatccctga atggactttt ttactaaagg aaagtgagaa 5400
gctaacgtcc accatcatta gaagatttca catgaaacct ggctcagttg aaagagaaaa 5460
tagtgtcaag ttgtccatga gaccagaggt agacttgata accacaaaga ttcattgaca 5520
atattttatt gtcattgata atgcaacaga aaaagtatgt actttaaaaa attgtttgaa 5580
aggaggttac ctctcattcc tctagaagaa aagcctatgt aacttcattt ccataaccaa 5640
tactttatat atgtaagttt atttattata agtatacatt ttatttatgt cagtttatta 5700
atatggattt atttatagaa aaattatctg atgttgatat ttgagtataa agcaaataat 5760
atztatgata ataactatag aaacaagata tcttaggctt taataaacac atgaatatca 5820
taaatcttct gtcttgtaat ttttctccct ttaatatcaa caataccatc atcgatcatca 5880
ttaccaatc attctcatga cttcatgctt gactcatatt atctggtaaa gtttg      5935

```

<210> 43

<211> 179

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<400> 43

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo antagonista del IL-10R β en la preparación de un medicamento para la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una respuesta de fase aguda, en la que dicha IL-TIF/IL-21 se selecciona entre:
 - (a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 43; o
 - (b) un polipéptido que tiene una identidad en aminoácidos de al menos el 60% respecto de un polipéptido de (a).
2. Un anticuerpo antagonista del IL-10R β para su uso en la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una respuesta de fase aguda, en la que dicha IL-TIF/IL-21 se selecciona entre:
 - (a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 43; o
 - (b) un polipéptido que tiene una identidad en aminoácidos de al menos el 60% respecto de un polipéptido de (a).
3. El uso de la reivindicación 1, en el que la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una respuesta de fase aguda da como resultado la inhibición de la inducción de una proteína de fase aguda seleccionada entre amiloide A sérico humano, anti-quimotripsina α 1 y haptoglobina.
4. El anticuerpo antagonista del IL-10R β para el uso de la reivindicación 2, en el que la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una respuesta de fase aguda da como resultado la inhibición de la inducción de una proteína de fase aguda seleccionada entre amiloide A sérico humano, anti-quimotripsina α 1 y haptoglobina.
5. Un procedimiento para la inhibición de la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda *in vitro* que comprende la puesta en contacto de una célula susceptible a la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda con un anticuerpo antagonista que se une específicamente a una molécula IL-10R β en una cantidad suficiente para inhibir la inducción por IL-TIF/IL-21 de una proteína de fase aguda, en la que dicha IL-TIF/IL-21 se selecciona entre:
 - (a) un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada entre la SEC ID N°: 40, SEC ID N°: 41 y SEC ID N°: 43; o

(b) un polipéptido que tiene una identidad en aminoácidos de al menos el 60% respecto de un polipéptido de (a);
y en la que dicha proteína de fase aguda es amiloide A sérico humano, anti-quimotripsina $\alpha 1$ y haptoglobina.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • US 4778879 A, Mertelsmann [0004]
- US 4490289 A, Stern [0004]
- US 4518584 A, Mark [0004]
- US 4851512 A, Miyaji [0004]
- US 4808611 A, Cosman [0004]
- 15 • US 5694234 A [0004]
- US 5650492 A [0004]
- US 5700664 A [0004]
- US 5371193 A [0004]
- US 5215895 A [0004]
- 20 • US 5728377 A [0004]
- US 5710251 A [0004]
- US 5328989 A [0004]
- US 5580753 A [0004]
- US 5587302 A [0004]
- 25 • US 5157112 A [0004]
- US 5208218 A [0004]
- US 5194375 A [0004]
- US 4965195 A [0004]
- US 5723120 A [0004]
- 30 • US 5178856 A [0004]
- US 5017691 A [0004]
- US 5164317 A [0007]
- WO 9708321 A, Levitt [0007]
- WO 9824904 A, Levitt [0007]
- 35 • WO 0024578 A [0009]
- US 5843697 A [0009]
- US 09419568 B [0118]
- US 09354243 B [0118]
- US 09178973 B [0118]
- 40

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Aggarwal et al. Human Cytokines: Handbook For Basic And Clinical Research. Blackwell Scientific Publications, 1992 [0004]

- "T-Cell Derived Cytokines And Their Receptors", and "Proinflammatory Cytokines and Immunity.". *Fundamental Immunology*. Raven Press, 1993, 763-836 [0004]
- Uyttenhove et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 6934 [0006]
- Van Snick et al. *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 363 [0006] [0042]
- 5 • Simpson et al. *Eur. J. Biochem.*, 1989, vol. 183, 715 [0006]
- Schmitt et al. *Eur. J. Immunol.*, 1989, vol. 19, 2167 [0007]
- Hültner et al. *Eur. J. Immunol.* [0007]
- Yang et al. *Blood*, 1989, vol. 74, 1880 [0007]
- Donahue et al. *Blood*, 15 June 1990, vol. 75 (12), 2271-2275 [0007]
- 10 • Williams et al. *Blood*, 01 September 1990, vol. 76, 306-311 [0007]
- Holbrook et al. *Blood*, 15 May 1991, vol. 77 (10), 2129-2134 [0007]
- Merz et al. *Blood*, 01 September 1990, vol. 78 (8), 1311-1317 [0007]
- Nicolaides et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13175-13180 [0007]
- Doull et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, vol. 153, 1280-1284 [0007]
- 15 • Holroyd et al. *Genomics*, 1998, vol. 52, 233-235 [0007]
- Temann et al. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 1307-1320 [0007]
- Godfraind et al. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3989-3996 [0007]
- McLane et al. *Am. J. Resp. Cell. Mol.*, 1999, vol. 19, 713-720 [0007]
- Louahed et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 5061-5070 [0008]
- 20 • Demoulin et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, 4710-4716 [0008]
- Dumoutier et al. *J. Immunology*, 2000, vol. 164, 1814-1819 [0009]
- Kotenko et al. *EMBO J.*, 1997, vol. 16 (19), 5894-5903 [0009]
- Gabay et al. *New England J. Med.*, 1999, vol. 340 (6), 448-454 [0009]
- Lacki et al. *Archivum Immunologiae et Therapiac Experimentalis*, 1995, vol. 43, 11-14 [0009]
- 25 • DiSanto et al. *Neuroimmunomodulation*, 1995, vol. 2, 149-154 [0009]
- Kruys et al. *Science*, 1989, vol. 245, 852 [0022]
- Demoulin et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, vol. 16, 4710 [0057]
- *Nat. Genet.*, 1997, vol. 15, 389-392 [0076]
- 30 • Ober et al. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, vol. 7 (9), 1393-1398 [0076]
- Nickel et al. *Genomic*, 1997, vol. 46 (1), 159-162 [0076]
- Takahashi et al. *Genomics*, 1997, vol. 44 (1), 150-2 [0076]
- Barnes et al. *Genomics*, 1996, vol. 37 (1), 41-50 [0076]
- Knappe et al. *J. Virol*, 2000, vol. 74, 3881-3887 [0077]
- 35 • Van Snick et al. *J. Exp. Med*, 1989, vol. 169, 363-368 [0097]