



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 128**

51 Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C07K 14/555 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01950827 .4**

86 Fecha de presentación : **29.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1294888**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **Proteína Zcyto21 tipo interferón.**

30 Prioridad: **30.06.2000 US 215446 P**
20.04.2001 US 285424 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es: **Sheppard, Paul, O.;**
Presnell, Scott, R.;
Fox, Brian, A.;
Gilbert, Teresa;
Haldeman, Betty, A. y
Grant, Francis, J.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 286 128 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína Zcyto21 tipo interferón.

5 Antecedentes de la invención

La diferenciación celular de los organismos multicelulares es controlada por hormonas y factores de crecimiento polipeptídicos. Estas moléculas difusibles permiten que las células se comuniquen entre sí y actúen en forma conjunta para formar tejidos y órganos, y para reparar y regenerar el tejido dañado. Algunos ejemplos de hormonas y factores de crecimiento son las hormonas esteroideas, la hormona paratiroidea, la hormona folículo estimulante, los interferones, las interleucinas, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, entre otros.

Las hormonas y los factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular uniéndose a proteínas receptoras. Determinados receptores son proteínas integrales de membrana que se unen a la hormona o al factor de crecimiento fuera de la célula, y que están ligados a las vías de señalización dentro de la célula, como los sistemas de segundo mensajero. Otras clases de receptores son las moléculas intracelulares solubles.

Generalmente, las citocinas estimulan la proliferación o diferenciación celular del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmunitaria e inflamatoria del cuerpo. Algunos ejemplos de citocinas que afectan la hematopoyesis son la eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de glóbulos rojos; la trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células del linaje megacariocítico; y el factor estimulante de colonias de granulocitos (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citocinas ayudan a recuperar los niveles normales de células sanguíneas en pacientes que tienen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciben quimioterapia para el cáncer. Las citocinas desempeñan una función importante en la regulación de la hematopoyesis y las respuestas inmunitarias, y pueden influir en el desarrollo de linfocitos.

La familia de citocinas humanas de clase II incluye los subtipos del interferón- α (IFN- α), interferón- β (IFN- β), interferón- γ (IFN- γ), IL-10, IL-19 (Patente de los EE. UU. 5.985.614), MDA-7 (Jiang *et al.*, *Oncogene* 11, 2477-2486, (1995)), IL-20 (Jiang *et al.*, *Oncogene* 11, 2477-2486, (1995)), IL-22 (Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 31335-31339, (2000)) y AK-155 (Knappe *et al.*, *J. Virol.* 74, 3881-3887, (2000)). La mayoría de las citocinas se unen a las señales y las transducen a través de los receptores de citocinas de Clase I o Clase II. Los miembros de la familia de receptores de citocinas humanas de clase II incluyen: interferón- α R1 (IFN- α R1), interferón- γ -R2 (IFN- γ -R2), interferón- γ R1 (IFN- γ R1), interferón- γ R2 (IFN- γ R2), IL-10R (Liu *et al.*, *J. Immunol.* 152, 1821-1829, (1994)), CRF2-4 (Lutfalla *et al. Genomics* 16, 366-373, (1993)), IL-20R β (Blumberg *et al.*, *Cell* 104, 9-19, (2001)) (también conocido como zcytor7 (Patente de los EE. UU. 5.945.511) y CRF2-8 (Kotenko *et al.*, *Oncogene* 19, 2557-2565, (2000)), IL-20R β (Blumberg *et al.*, *ibid.*, (2001)) (también conocido como DIRS1 (PCT WO 99/46379)), IL-22RA1 (receptor- α 1 de la IL-22, presentado ante la HUGO para su aprobación) (también conocido como IL-22R (Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 31335-31339, (2000)), zcytor11 (Patente de los EE. UU. 5.965.704) y CRF2-9 (Kotenko *et al.*, *Oncogene* 19, 2557-2565, (2000)), y factor tisular.

Habitualmente, los receptores de citocinas de clase II son heterodímeros compuestos por dos cadenas distintas de receptores, las subunidades de receptores α y β (Stahl *et al.*, *Cell* 74, 587-590, (1993)). En general, las subunidades α son las principales proteínas de unión a citocinas, y las subunidades β son necesarias para la formación de sitios de unión de alta afinidad, así como para la transducción de las señales. Una excepción es el receptor de la IL-20, en el que ambas subunidades son necesarias para la unión de la IL-20 (Blumberg *et al.*, *ibid.*, (2001)).

Los receptores de citocinas de clase II son identificados por un dominio de unión a citocinas conservado de aproximadamente 200 aminoácidos (D200) en la porción extracelular del receptor. Este dominio de unión a citocinas está formado por dos dominios de fibronectina tipo III (FnIII) de aproximadamente 100 aminoácidos cada uno (Bazan J.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6934-6938, (1990); Thoreau *et al.*, *FEBS Lett.* 282, 16-31, (1991)). Cada dominio de FnIII contiene residuos de Cys, Pro y Trp conservados, que determinan un patrón de plegamiento característico de siete cadenas β similar al dominio constante de las inmunoglobulinas (Uze *et al.*, *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 3-26, (1995)). Los elementos estructurales conservados de la familia de receptores de citocinas de clase II posibilitan la identificación de nuevos miembros de esta familia en función de la homología de la secuencia de aminoácidos primaria. Usando este enfoque, hemos identificado previamente con éxito dos nuevos miembros de la familia de receptores de citocinas de clase II, el zcytor7 (Patente de los EE. UU. 5.945.511) (también conocido como IL-20R α (Blumberg *et al.*, *ibid.*, (2001)) y el zcytor11 (Patente de los EE. UU. 5.965.704) (también conocido como IL-22R (Blumberg *et al.*, *ibid.*, (2001))). La identificación de nuevos miembros adicionales de la familia de receptores de citocinas de clase II es de interés dado que las citocinas desempeñan una función fundamental en la regulación de las respuestas biológicas.

La IL-22, también conocida como IL-TIF (factor inducible derivado de células T relacionado con la IL-10) (Dumoutier *et al.*, *J. Immunology* 164, 1814-1819, (2000)), es un homólogo de la IL-10 descrito recientemente. La IL-22 de ratón se identificó originalmente como un gen inducido por la IL-9 en las células T y los mastocitos *in vitro* (Dumoutier *et al.*, *J. Immunology* 164, 1814-1819, (2000)). Se observó actividad de inducción de reactantes de fase aguda en hígado de ratón después de la inyección de IL-22, y se indujo rápidamente la expresión de la IL-22 después de la inyección de lipopolisacáridos (LPS), lo que sugiere que la IL-22 contribuye a la respuesta inflamatoria *in vivo* (Dumoutier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10144-10149, (2000)).

Las interleucinas son una familia de citocinas que median las respuestas inmunitarias, incluida la inflamación. Las interleucinas median diversas patologías inflamatorias. La célula T es fundamental para la respuesta inmunitaria, ya que produce muchas citocinas e inmunidad adaptativa a los antígenos. Las citocinas producidas por la célula T se han clasificado en tipo 1 y tipo 2 (Kelso, A. *Immun. Cell Biol.* 76:300-317, 1998). Las citocinas tipo 1 incluyen: IL-2, IFN- γ y LT- α , y participan en las respuestas inflamatorias, la inmunidad a los virus, la inmunidad a los parásitos intracelulares y el rechazo de aloinjertos. Las citocinas tipo 2 incluyen: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y participan en las respuestas humorales, la inmunidad a los helmintos y la respuesta alérgica. Las citocinas que pertenecen tanto al Tipo 1 y al Tipo 2 incluyen: IL-3, GM-CSF y TNF- α . Existen evidencias que sugieren que las poblaciones de células T que producen el Tipo 1 y el Tipo 2 migran preferentemente a diferentes tipos de tejido inflamado.

Desde el punto de vista terapéutico, resultan de particular interés los interferones (pueden encontrarse revisiones sobre los interferones en la publicación de De Maeyer y De Maeyer-Guignard, "Interferons", en *The Cytokine Handbook, 3.a edición*, Thompson (ed.), páginas 491-516 (Academic Press Ltd. 1998), y la publicación de Walsh, *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, páginas 158-188 (John Wiley & Sons 1998)). Los interferones exhiben diversas actividades biológicas, y son útiles para el tratamiento de determinadas enfermedades autoinmunitarias y ciertos tipos de cáncer, y el fortalecimiento de la respuesta inmunitaria contra los agentes infecciosos, incluidos los virus, las bacterias, los hongos y los protozoos. Hasta la fecha, se han identificado seis formas de interferón, que se han clasificado en dos grupos principales. Los interferones denominados "tipo I" incluyen: interferón- α , interferón- β , interferón- ω , interferón- δ e interferón- τ . En la actualidad, el interferón- γ y una subclase del interferón- α son los únicos tipos de interferones tipo II.

Los interferones tipo I, que se cree derivan del mismo gen ancestral, han conservado una estructura lo suficientemente similar para actuar mediante el mismo receptor de superficie celular. La cadena- α del receptor del interferón- α/β humano comprende un dominio N terminal extracelular que tiene las características de un receptor de citocinas de clase II. El interferón- γ no comparte una homología significativa con los interferones tipo I ni con el subtipo de interferón- α tipo II, pero comparte diversas actividades biológicas con los interferones tipo I.

En los seres humanos, al menos 16 genes no alélicos codifican diferentes subtipos de interferón- α , mientras que los interferones β y ω son codificados por genes individuales. Los genes del interferón tipo I se agrupan en el brazo corto del cromosoma 9. A diferencia de los genes humanos estructurales típicos, el interferón- α , el interferón- β y el interferón- ω carecen de intrones. Un gen individual para el interferón- γ humano se encuentra en el cromosoma 12 y contiene tres intrones. Hasta la fecha, el interferón- τ ha sido descrito únicamente en ganado vacuno y ovino, mientras que el interferón- δ ha sido descrito únicamente en cerdos.

Los médicos clínicos están aprovechando las múltiples actividades de los interferones mediante el uso de las proteínas para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones. Por ejemplo, una forma de interferón- α ha sido aprobada para su uso en más de 50 países, para el tratamiento de condiciones médicas como la tricoleucemia, el carcinoma de células renales, el carcinoma de células basales, el melanoma maligno, el sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, el mieloma múltiple, la leucemia mielógena crónica, el linfoma no Hodgkin, la papilomatosis laríngea, la micosis fungoide, el condiloma acuminado, la hepatitis B crónica, la hepatitis C, la hepatitis D crónica y la hepatitis no A, no B/C crónica. La Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA) de los EE. UU. ha aprobado el uso del interferón- β para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad crónica del sistema nervioso. El interferón- γ se utiliza para tratar las enfermedades granulomatosas crónicas, en las que el interferón fortalece la respuesta inmunitaria del paciente para destruir los patógenos bacterianos, fúngicos y protozoarios infecciosos. Los estudios clínicos también indican que el interferón- γ puede ser útil para el tratamiento del SIDA, la leishmaniasis y la lepra lepromatosa.

Brack *et al.*, (Gene 15:379-394, 1981) llegaron a la conclusión de que existen, al menos, 11 genes o secuencias pseudogénicas diferentes, de los tipos de interferón- α , en el genoma humano. La patente EP 0.032.134 hace referencia a las secuencias de ADN y los procesos para producir interferón y polipéptidos similares al interferón. La publicación WO 02/092762 hace referencia a los polipéptidos de citocinas IMX129840 y a los métodos para elaborarlos y usarlos.

Sheppard, P. *et al.*, Nature Immunology (2003), 4(1), pág. 63-68, describen la IL-28, la IL-29 y su receptor de citocinas de clase II IL-28R.

Kotenko, SV. *et al.*, Nature Immunology (2003), 4(1), pág. 69-77, describen la forma en que los IFN- λ median la protección antiviral a través de un complejo diferente de receptores de citocinas de clase II.

Vilcek, J., Nature Immunology (2003), 4(1), pág. 8-9, describe la identificación de una familia de interferones que tienen propiedades similares a los IFN tipo I, pero son diferentes desde el punto de vista estructural y genético.

Burge, C. y Karlin, S., J. Mol. Biol. (1997), 268, pág. 78-94, describen la predicción de estructuras génicas completas en el ADN genómico humano.

Las actividades *in vivo* demostradas de la familia de las citocinas ejemplifican el enorme potencial clínico de otras citocinas, agonistas de citocinas y antagonistas de citocinas, y la necesidad que existe de contar con ellos. La presente invención aborda estas necesidades proporcionando una nueva citocina que estimula las células del linaje de células hematopoyéticas, así como composiciones y métodos relacionados.

ES 2 286 128 T3

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.

5 La presente invención también proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 90% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2, donde el polipéptido aislado tiene actividad antiviral.

10 La Figura es un perfil de hidrofiliidad de Hopp/Woods de la secuencia de proteínas del Zcyto21 mostrada en la SEC. ID. N.º 2. El perfil se basa en una ventana desplazable de seis residuos. Se ignoraron los residuos ocultos G, S y T y los residuos expuestos H, Y y W. Estos residuos se indican en la figura con letras minúsculas.

Antes de presentar la invención en forma detallada, puede ser útil definir los siguientes términos para su posterior comprensión:

15 El término “etiqueta de afinidad” se utiliza en la presente para denotar un segmento de un polipéptido que se puede unir a un segundo polipéptido para permitir la purificación o detección del segundo polipéptido o brindar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para los cuales haya disponibles un anticuerpo u otro agente de unión específico, se puede utilizar como etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, la proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1988), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido FlagTM (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204-10, 1988), péptido de unión a la estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991. Los ADN que codifican etiquetas de afinidad se pueden obtener de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

25 El término “variante alélica” se utiliza en la presente para denotar cualesquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación y puede tener como consecuencia el polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

30 Los términos “amino terminal” y “carboxilo terminal” se utilizan en la presente para denotar posiciones dentro de los polipéptidos. Donde el contexto lo permite, dichos términos se usan con referencia a una secuencia o porción en particular de un polipéptido para denotar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxilo terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está ubicada en posición proximal al carboxilo terminal de la secuencia de referencia, pero no necesariamente se encuentra en el carboxilo terminal del polipéptido completo.

40 El término “par de complemento/anticomplemento” denota fracciones no idénticas que forman un par estable asociado en forma no covalente en las condiciones adecuadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros ejemplos de pares de complemento/anticomplemento incluyen pares de receptor/ligando, antígeno/anticuerpo (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos codificantes/no codificantes y similares. Donde la posterior disociación del par de complemento/anticomplemento resulta deseable, el par de complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de $<10^9$ M⁻¹.

50 El término “complementos de una molécula de polinucleótido” denota una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de bases complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de la 5' CCCGTGCAT 3'.

55 El término “secuencia de nucleótidos degenerada” denota una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácidos (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican Asp).

60 El término “vector de expresión” se utiliza para denotar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés ligado operablemente a segmentos adicionales que permiten su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen secuencias de promotores y terminadores, y también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Generalmente, los vectores de expresión provienen de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos.

65 El término “aislado”, cuando se aplica a un polinucleótido, denota que el polinucleótido ha sido extraído de su medio genético natural y, por lo tanto, no contiene otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas mediante genomanipulación. Dichas moléculas aisladas son aquellas separadas de su medio natural, e incluyen los clones de ADNc y genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención no contienen otros genes con los que se las asocia comúnmente, pero pueden

ES 2 286 128 T3

incluir las regiones naturales 5' y 3' no traducidas, como los promotores y los terminadores. La identificación de las regiones asociadas será evidente para una persona con conocimientos generales de la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316:774-78, 1985).

5 Un polipéptido o proteína “aislado” es un polipéptido o una proteína que se encuentra en una condición distinta de su entorno original, como por ejemplo, separado de la sangre y el tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado no contiene sustancialmente otros polipéptidos, en particular otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir, con una pureza mayor del 95%; más preferentemente, mayor del 99%. Al usarlo en este contexto, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, como alternativa, en formas glucosiladas o derivatizadas.

15 El término “neoplásicas”, al referirse a las células, indica células que experimentan una proliferación nueva y anormal, y descontrolada y progresiva, lo que provoca una neoplasia. Las células neoplásicas pueden ser malignas, es decir, invasivas y metastásicas, o benignas.

20 El término “ligados operablemente”, al referirse a los segmentos de ADN, indica que los segmentos están distribuidos de modo tal que funcionan en forma conjunta para alcanzar sus fines, p. ej., la transcripción se inicia en el promotor y avanza por el segmento codificante hasta el terminador.

El término “ortólogo” denota un polipéptido o una proteína obtenidos de una especie que es la contraparte funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre los ortólogos son el resultado de la especiación.

25 Los “parálogos” son proteínas diferentes pero estructuralmente relacionadas producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por duplicación génica. Por ejemplo, la α -globina, la β -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

30 Un “polinucleótido” es un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos leídas desde el extremo 5' hasta el 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (cuya abreviatura es “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Donde el contexto lo permite, los últimos dos términos pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias, se utiliza para denotar la longitud total y se entenderá que es equivalente al término “pares de bases”. Los especialistas en la materia reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferir levemente en cuanto a su longitud, y que sus extremos pueden estar escalonados como resultado de una segmentación enzimática; por lo tanto, pueden no estar apareados todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido bicatenaria.

40 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por uniones peptídicas, sea producido en forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de alrededor de 10 residuos de aminoácidos se conocen comúnmente como “péptidos”.

45 El término “promotor” se utiliza en la presente por su significado reconocido en la especialidad para denotar una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Comúnmente, pero no siempre, las secuencias de promotores se encuentran en las regiones no codificantes 5' de los genes.

50 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser agregados a una proteína por la célula en la cual se produce dicha proteína y varían según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente en función de la estructura de sus esqueletos de aminoácidos; en general, los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato no se especifican, aunque pueden estar presentes.

55 El término “receptor” denota una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media el efecto del ligando en la célula. Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples péptidos que comprende un dominio extracelular de unión a ligandos y un dominio efector intracelular que habitualmente participa en la transducción de las señales. La unión del ligando al receptor tiene por consecuencia un cambio en la conformación del receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y las demás moléculas de la célula. Esta interacción, a su vez, lleva a una alteración del metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que se vinculan con las interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (p. ej., receptor de la hormona estimuladora de la tiroides, receptor adrenérgico beta) o multiméricos (p. ej., receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF), receptor de la hormona de crecimiento, receptor de la IL-3, receptor del GM-CSF, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), receptor de la eritropoyetina y receptor de la IL-6).

ES 2 286 128 T3

El término “secuencia señal de secreción” denota una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido de secreción”) que, como componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor a través de una vía de secreción de una célula en la que es sintetizado. Comúnmente, el polipéptido mayor es segmentado para eliminar el péptido de secreción durante el tránsito por la vía de secreción.

El término “variante de empalme” se usa en la presente para denotar formas alternativas de ARN transcrito de un gen. La variación por empalme surge naturalmente a través del uso de sitios de empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita o, menos comúnmente, entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede tener como consecuencia varios ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de empalme también se usa en la presente para denotar una proteína codificada por una variante de empalme de un ARNm transcrito de un gen.

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados mediante métodos analíticos imprecisos (p. ej., electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando uno de dichos valores se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor X expresado tiene una exactitud de $\pm 10\%$.

Todas las referencias citadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

El gen *Zcyto21* codifica un polipéptido de 200 aminoácidos, mostrado en la SEC. ID. N.º 2. Puede predecirse que la secuencia señal del *Zcyto21* comprende los residuos de aminoácidos 1 (Met) a 19 (Ala) de la SEC. ID. N.º 2. El péptido maduro del *Zcyto21* comienza en el residuo de aminoácido 20 (Gly).

El gen *Zcyto21* se encuentra en las secuencias AC011445 y AC018477 del BAC, que se han localizado por mapeo en el cromosoma humano 19q13.13. Esta región del cromosoma 19 también puede comprender un grupo de genes similares a los del interferón. En la SEC. ID. N.º 6, se muestra un ADNc de consenso con una secuencia de polinucleótidos del *Zcyto21*, y el polipéptido codificado por dicho ADNc se muestra en la SEC. ID. N.º 7.

Como se describe más abajo, la presente invención proporciona polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, al menos, un 90% o un 95% a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2. La presente invención también proporciona polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, al menos, un 70%; al menos, un 80%; o, al menos, un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los residuos de aminoácidos 20 a 219 de la SEC. ID. N.º 9 o los residuos de aminoácidos 1 a 219 de la SEC. ID. N.º 9. La presente invención también proporciona polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, al menos, un 70%; al menos, un 80%; o, al menos, un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los residuos de aminoácidos 20 a 203 de la SEC. ID. N.º 12 o los residuos de aminoácidos 1 a 203 de la SEC. ID. N.º 12. La presente invención también incluye un polipéptido que también comprende una secuencia señal de secreción que reside en una posición amino terminal en relación con la primera secuencia de aminoácidos, donde la secuencia señal de secreción comprende los residuos de aminoácidos 1 a 19 de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2.

En general, se prevé que las citocinas tendrán una estructura de cuatro hélices alfa, en la que las hélices A, C y D serán las más importantes en las interacciones ligando-receptor, y estarán muy conservadas entre miembros de la familia. No obstante, los interferones (INF), en particular el interferón alfa y el interferón tau, se caracterizan como haces de seis hélices. La hélice A del INF es equivalente a la hélice A del *Zcyto21*; la hélice B del INF es equivalente a la hélice C del *Zcyto21*; la hélice C del INF es equivalente a la hélice D del *Zcyto21*; y la hélice D del INF es equivalente a la hélice F del *Zcyto21*. Por ende, el asa entre el asa AB y el asa CD del INF se expande en el *Zcyto21* para contener las hélices cortas B y E del *Zcyto21*.

Se predice que las hélices del *Zcyto21* serán las siguientes: la hélice A está definida por los residuos de aminoácidos 49 (Ser) a 63 (Leu); la hélice B por los residuos de aminoácidos 76 (Asn) a 84 (Val); la hélice C por los residuos de aminoácidos 89 (Val) a 104 (Ala); la hélice D por los residuos de aminoácidos 111 (Glu) a 133 (Gln); la hélice E por los residuos de aminoácidos 137 (Thr) a 158 (Lys); y la hélice F por los residuos de aminoácidos 163 (Gly) a 189 (Leu); como se muestra en la SEC. ID. N.º 2. Los residuos de cisteína entre el *Zcyto21* y el INF- α se conservan y pueden formar una unión disulfuro intermolecular, en particular para formar homodímeros con moléculas de *Zcyto21* adicionales. La realización de más análisis del *Zcyto21* sobre la base de alineamientos múltiples predice que las cisteínas de los residuos de aminoácidos 34 y 131, y 68 y 164, (como se muestra en la SEC. ID. N.º 2) formarán uniones disulfuro intramoleculares. La cisteína del residuo 190 es libre, y puede formar una asociación disulfuro intermolecular. Los correspondientes polinucleótidos que codifican las regiones, los dominios, los motivos, los residuos y las secuencias del polipéptido del *Zcyto21* descritos en la presente se muestran en la SEC. ID. N.º 1. La secuencia de polinucleótidos degenerada de la SEC. ID. N.º 2 se muestra en la SEC. ID. N.º 3. La secuencia de polinucleótidos degenerada de la SEC. ID. N.º 9 se muestra en la SEC. ID. N.º 10. La secuencia de polinucleótidos degenerada de la SEC. ID. N.º 12 se muestra en la SEC. ID. N.º 13.

El análisis mutacional detallado de la IL-2 murina (Zurawski *et al.*, *EMBO J.* 12:5113-5119, 1993) indica que los residuos en las hélices A y C son importantes para la unión al IL-2R β ; los residuos fundamentales son Asp₃₄, Asn₉₉ y Asn₁₀₃. Múltiples residuos dentro del asa A/B y la hélice B de la IL-2 murina son importantes para la unión al IL-2R α , mientras que un solo residuo, el Gln₁₄₁ en la hélice D, es fundamental para la unión con el IL-2R α . En forma similar, las hélices A y C son sitios de interacción entre la IL-4 y el IL-4R α (estructuralmente similar al IL-2R α), y los

residuos dentro de la hélice D son vitales para la interacción con el IL-2R α (Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1657-1662, 1997; Kruse *et al.*, *EMBO J.* 11:3237-3244, 1992). En particular, la mutación Tyr₁₂₄ a Asp en la IL-4 humana crea un antagonista, que se une al IL-4R α pero no al IL-2R α y, por lo tanto, no puede enviar una señal (Kruse *et al. ibid.* 1992).

5

Las citocinas con un haz de cuatro hélices también se agrupan por la longitud de las hélices que las componen. Las citocinas de "hélice larga" generalmente están formadas por hélices de entre 24 y 30 residuos, e incluyen la IL-6, el factor neurotrófico ciliar (ciliary neurotrophic factor, CNTF), el factor inhibidor de la leucemia (leukemia inhibitory factor, LIF) y la hormona de crecimiento humana (human growth hormone, hGH). Las citocinas de "hélice corta" generalmente están formadas por hélices de entre 18 y 21 residuos, e incluyen la IL-2, la IL-4 y el GM-CSF. Estudios en los que se utilizó el CNTF y la IL-6 demostraron que puede intercambiarse una hélice del CNTF por la hélice equivalente de la IL-6, y de esta forma se brindan a la quimera propiedades de unión al CNTF. Por ende, esos dominios funcionales de citocinas de cuatro hélices se determinan en función de la homología estructural, independientemente de la identidad de secuencias, y pueden mantener la integridad funcional en una quimera (Kallen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:11859-11867, 1999). Por lo tanto, los dominios helicoidales del Zcyto21 serán de utilidad para la preparación de moléculas quiméricas de fusión, en particular con otros interferones, para determinar y modular la especificidad de unión a los receptores. De particular interés son las proteínas de fusión que combinan los dominios helicoidales y de asas de los interferones y las citocinas, como el INF- α , la IL-10 y la hormona de crecimiento humana.

El ARNm del Zcyto21 ha sido identificado en los tejidos de cerebro, islote, próstata, testículos, hipófisis, placenta, tumor ovárico, tumor pulmonar, tumor rectal y tumor ovárico, así como en una línea de inmunocitos activados (CD3+) y en una línea de células epiteliales de la próstata, que han sido transformadas con el virus del papiloma humano (human papilloma virus, HPVS) IV.

La presente invención proporciona moléculas de polinucleótido, incluidas moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos del Zcyto21 divulgados en la presente. Los especialistas en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible que exista una variación considerable en las secuencias entre estas moléculas de polinucleótidos. Las SEC. ID. N.º 3, 10 y 13 son secuencias de ADN degeneradas que abarcan todos los ADN que codifican el polipéptido del Zcyto21 de las SEC. ID. N.º 2, 9 y 12, respectivamente. Los especialistas en la materia reconocerán que la secuencia degenerada de la SEC. ID. N.º 3, por ejemplo, también proporciona todas las secuencias de ARN que codifican la SEC. ID. N.º 2, sustituyendo T por U. Por ende, la presente invención contempla los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del Zcyto21 que comprenden los nucleótidos 1 ó 58 al 603 de la SEC. ID. N.º 3, y sus equivalentes de ARN. La Tabla 1 presenta los códigos de una sola letra utilizados dentro de la SEC. ID. N.º 3 para denotar posiciones de nucleótidos degenerados. Las "resoluciones" son nucleótidos denotados con una letra del código. El "complemento" indica el código del (de los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y denota C o T y su complemento R denota A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

40

TABLA 1

45

50

55

60

65

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T

ES 2 286 128 T3

B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Los codones degenerados utilizados en las SEC. ID. N.º 3, 10 y 13, que abarcan todos los codones posibles de un aminoácido dado, se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Aminoácido	Código de una sola letra	Codones	Codón degenerado
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAV
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG

ES 2 286 128 T3

Ter	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B	RAY
Glu Gln	Z	SAR
Cualquiera	X	NNN

10 Una persona con conocimientos generales de la materia apreciará que se introduce cierta ambigüedad al determinar un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en ciertas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en ciertas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. Por ende, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada
 15 pueden codificar variantes de secuencias de aminoácidos, pero una persona con conocimientos generales de la materia puede identificar fácilmente dichas variantes de secuencias por referencia a la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2. La funcionalidad de las variantes de las secuencias se puede probar fácilmente según se describe en la presente.

20 Una persona con conocimientos generales de la materia también apreciará que diferentes especies pueden mostrar el “uso de codones preferenciales”. En general, véanse Grantham, *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 8:1893-912, 1980; Haas, *et al. Curr. Biol.* 6:315-24, 1996; Wain-Hobson, *et al.*, *Gene* 13:355-64, 1981; Grosjean y Fiers, *Gene* 18:199-209, 1982; Holm, *Nuc. Acids Res.* 14:3075-87, 1986; Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573-97, 1982. Tal como se los usa en la presente, los términos “uso de codones preferenciales” o “codones preferenciales” constituyen una expresión de la materia que hace referencia a codones de traducción de proteínas que se utilizan más frecuentemente en las células de una especie
 25 determinada, favoreciendo de ese modo a uno o a unos pocos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase la Tabla 3). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede ser codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en las células de los mamíferos, ACC es el codón usado más comúnmente; en otras especies, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, es posible que sean preferenciales otros codones de Thr distintos. Los codones preferenciales para una especie en particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención mediante una serie de métodos conocidos por los especialistas en la materia. La introducción de secuencias de codones preferenciales en el ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo que la traducción de la proteína sea más eficiente dentro de un tipo o especie celular en particular.
 30 Por lo tanto, la secuencia de codones degenerados divulgada en la SEC. ID. N.º 3 sirve como plantilla para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos y especies celulares que se usan habitualmente en la especialidad y se divulgan en la presente. Las secuencias que contienen codones preferenciales pueden probarse y optimizarse para su expresión en diversas especies y su funcionalidad puede probarse según se divulga en la presente.

Como se señaló anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los métodos para preparar ADN y ARN son bien conocidos por los especialistas en la materia. En general, el ARN se aísla
 40 a partir de un tejido o una célula que produce grandes cantidades de ARN del Zcyto21. Dichos tejidos y células se identifican mediante el análisis Northern blot (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201, 1980) o cribando el medio condicionado de diversos tipos celulares para detectar la actividad en las células o el tejido diana. Una vez identificada la actividad o la célula o el tejido que produce el ARN, el ARN total puede prepararse extrayendo el isotiocianato de guanidinio, y realizando luego el aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:52-94, 1979). Se prepara ARN poli(A)⁺ a partir del ARN total usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-12, 1972). Se prepara ADN complementario (ADNc) a partir del ARN poli(A)⁺ usando los métodos conocidos. Como alternativa, puede aislarse el ADN genómico. Luego, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del Zcyto21 se identifican y aíslan mediante, por ejemplo, hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR).

50 Puede obtenerse un clon más largo que codifica el Zcyto21 mediante los procedimientos de clonación convencionales. Se prefieren los clones de ADN complementario (ADNc), aunque para algunas aplicaciones (p. ej., expresión en animales transgénicos) puede ser preferible usar un clon genómico, o modificar un clon de ADNc para que incluya, al menos, un intrón genómico. Los métodos para preparar clones de ADNc y genómicos son bien conocidos para quienes cuentan con conocimientos generales de la materia, e incluyen el uso de la secuencia divulgada en la presente,
 55 o partes de ella, para sondear o cebar una genoteca. Las genotecas de expresión pueden sondarse con anticuerpos contra fragmentos receptores del Zcyto21, u otros elementos de unión específicos.

60 La presente invención también proporciona polipéptidos y polinucleótidos que representan contrapartes de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, entre otras, especies de mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados e invertebrados. De particular interés resultan los polipéptidos del Zcyto21 de otras especies de mamíferos, incluidos los murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros polipéptidos de primates. Los ortólogos del Zcyto21 humano se pueden clonar usando información y composiciones provistas por la presente invención en combinación con las técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc puede clonarse usando ARNm obtenido de un tejido o tipo celular que exprese el Zcyto21 según se divulga en la presente.
 65 Pueden identificarse fuentes adecuadas de ARNm por sondaje de Northern blots con sondas diseñadas a partir de las secuencias divulgadas en la presente. Luego se prepara una genoteca a partir de ARNm de un tejido o una línea celular positivos. Luego, puede aislarse un ADNc que codifique el Zcyto21 con diversos métodos, por ejemplo, el sondaje

con un ADNc humano completo o parcial, o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas sobre la base de las secuencias divulgadas. Un ADNc también puede clonarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa, también denominada PCR (Mullis, Patente de los EE. UU. N.º 4.683.202), con cebadores diseñados a partir de la secuencia representativa del Zcyto21 humano divulgada en la presente. Dentro de un método adicional, la genoteca de ADNc puede utilizarse para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra el polipéptido del Zcyto21, estudios de unión o valoraciones de la actividad. Pueden aplicarse técnicas similares para el aislamiento de clones genómicos.

Los especialistas en la materia reconocerán que la secuencia divulgada en la SEC. ID. N.º 1 representa un único alelo del Zcyto21 humano y que se prevé que se produzcan variación alélica y empalmes alternativos. Las variantes alélicas de esta secuencia pueden clonarse sondando genotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos según los procedimientos estándar. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N.º 1, incluidas aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones provocan cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención, ya que son proteínas que constituyen variantes alélicas de la SEC. ID. N.º 2. Los ADNc generados a partir de ARNm empalmados en forma alternativa, que conservan las propiedades del polipéptido del Zcyto21, están incluidos dentro del alcance de la presente invención, al igual que los polipéptidos codificados por dichos ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y las variantes por empalme de estas secuencias pueden clonarse por sondaje de genotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos o tejidos según los procedimientos estándar conocidos en la especialidad. Se muestran ejemplos de variantes empalmadas en forma alternativa en la SEC. ID. N.º 8 (SEC. ID. N.º 9 para el polipéptido correspondiente) y en la SEC. ID. N.º 11 (SEC. ID. N.º 12 para el polipéptido correspondiente). En la SEC. ID. N.º 4, se muestra un ejemplo de una variante alélica, que corresponde a la secuencia de polipéptidos mostrada en la SEC. ID. N.º 5. Existe un polimorfismo entre la secuencia de polipéptidos mostrada en la SEC. ID. N.º 1 y la mostrada en la SEC. ID. N.º 4 en el nucleótido número 572. Este polimorfismo puede crear un antagonista del Zcyto21 o una molécula de función reducida o alterada, lo que puede provocar una mayor probabilidad de que se presente susceptibilidad a las enfermedades.

La presente invención también proporciona reactivos, que serán de utilidad en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, el gen Zcyto21, una sonda que comprende ADN o ARN del Zcyto21, o una secuencia de estos, puede utilizarse para determinar si el gen Zcyto21 está presente en un cromosoma humano, como el cromosoma 19, o si se ha producido una mutación génica. El Zcyto21 está ubicado en la región q13.13 del cromosoma 19. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen Zcyto21 incluyen, a modo de ejemplo, aneuploidía, cambios en la cantidad de copias del gen, pérdida de heterogeneidad (loss of heterogeneity, LOH), translocaciones, inserciones, eliminaciones, cambios en los sitios de restricción y rearrreglos. Dichas aberraciones pueden detectarse usando los polinucleótidos de la presente invención empleando técnicas genéticas moleculares, como el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP), el análisis de las repeticiones en tándem cortos (short tandem repeat, STR) con técnicas de PCR, y otras técnicas de análisis de enlace genético conocidas en la especialidad (Sambrook *et al.*, *ibid.*; Ausubel *et al.*, *ibid.*; Marian, *Chest* 108:255-65, 1995).

El conocimiento preciso de la posición de un gen puede ser útil para diversos fines, entre los que se incluyen: 1) determinar si una secuencia es parte de una contig existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, como clones de YAC, BAC o ADNc; 2) proporcionar un posible gen candidato para una enfermedad heredable que muestre una conexión con la misma región cromosómica; y 3) usar como referencia cruzada organismos modelo, como el ratón, que puedan ayudar a determinar qué función puede tener un gen en particular.

Por ejemplo, Delague *et al.*, (Am. J. Hum. Genet. 67: 236-243, 2000) identificaron que la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth está ubicada en 19q13.1-13.3 (Delague *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 67: 236-243, 2000).

Un diagnóstico podría ayudar a los médicos a determinar el tipo de enfermedad y el tratamiento asociado apropiado, o a brindar asesoramiento genético. Como tales, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos contra el Zcyto21 de la invención pueden utilizarse para la detección del polipéptido del Zcyto21, el ARNm o los anticuerpos contra el Zcyto21, y así servir como marcadores, y pueden usarse directamente para la detección de enfermedades genéticas o distintos tipos de cáncer, como se describe en la presente, mediante métodos conocidos en la especialidad y descritos en la presente. Además, las sondas de polinucleótidos del Zcyto21 pueden utilizarse para detectar anomalías o genotipos asociados con eliminaciones y translocaciones del cromosoma 19 asociadas con enfermedades humanas, u otras translocaciones relacionadas con la progresión de tumores malignos u otras mutaciones en 19q13.13, que se prevé participan en los rearrreglos cromosómicos que tienen lugar en los tumores malignos; o en otros tipos de cáncer. De modo similar, las sondas de polinucleótidos del Zcyto21 pueden utilizarse para detectar anomalías o genotipos asociados con la trisomía cromosómica 19q13.13 y la pérdida de cromosomas asociada con las enfermedades humanas o el aborto espontáneo. Por ende, las sondas de polinucleótidos del Zcyto21 pueden utilizarse para detectar anomalías o genotipos asociados con estos defectos.

En general, los métodos de diagnóstico utilizados en los análisis de ligamiento genético para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente son conocidos en la especialidad. Por lo general, las sondas analíticas tendrán una longitud de, al menos, 20 nt; aunque pueden utilizarse sondas un poco más cortas (p. ej., 14-17 nt). Los cebadores para PCR tienen una longitud de, al menos, 5 nt; preferentemente, 15 o más; más preferentemente, entre 20 y 30 nt. Para el análisis macroscópico de los genes, o el ADN cromosómico, una sonda de polinucleótidos del Zcyto21 puede comprender un exón completo o más. Un especialista en la materia puede determinar con facilidad los exones comparando las secuencias del Zcyto21 (SEC. ID. N.º 1) con el ADN genómico del Zcyto21. En general, los métodos de diagnósti-

co utilizados en los análisis de ligamiento genético para detectar una anomalía o aberración genética en un paciente son conocidos en la especialidad. La mayoría de los métodos de diagnóstico comprenden los siguientes pasos: (a) obtener una muestra genética de un paciente posiblemente enfermo, un paciente enfermo o un posible portador no enfermo del alelo de una enfermedad recesiva; (b) producir un primer producto de reacción incubando la muestra genética con una sonda de polinucleótidos del Zcyto21 donde el polinucleótido se hibridará con una secuencia de polinucleótidos complementaria, como en el análisis del RFLP, o incubando la muestra genética con cebadores codificantes y no codificantes en una reacción PCR en condiciones de reacción PCR apropiadas; (iii) visualizar el primer producto de reacción mediante electroforesis en gel y/u otro método conocido, como visualizar el primer producto de reacción con una sonda de polinucleótidos del Zcyto21 donde el polinucleótido se hibridará con la secuencia de polinucleótidos complementaria de la primera reacción; y (iv) comparar el primer producto de reacción visualizado con un segundo producto de reacción de control de una muestra genética de un paciente genéticamente intacto. Una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción de control indica una anomalía genética en el paciente enfermo o posiblemente enfermo, o la presencia de un fenotipo portador recesivo heterocigota para un paciente no enfermo, o la presencia de un defecto genético en un tumor de un paciente enfermo, o la presencia de una anomalía genética en un feto o embrión antes de la implantación. Por ejemplo, una diferencia en el patrón de fragmentos de restricción, la longitud de los productos de la PCR, la longitud de las secuencias repetitivas del locus genético del Zcyto21, y otros similares, indican una anomalía genética, una aberración genética o una diferencia alélica en comparación con el control normal genéticamente intacto. Los controles pueden ser de miembros no afectados de la familia, o de personas que no tienen un parentesco, dependiendo de la prueba y la disponibilidad de las muestras. Las muestras genéticas para uso dentro de la presente invención incluyen: ADN genómico, ARNm y ADNc aislados de cualquier tejido u otra muestra biológica de un paciente, como por ejemplo, sangre, saliva, semen, células embrionarias, líquido amniótico y similares. La sonda o el cebador de polinucleótidos puede ser ARN o ADN, y comprenderá una porción de la SEC. ID. N.º 1, el complemento de la SEC. ID. N.º 1, o un equivalente de ARN de estos. Dichos métodos para mostrar el análisis de enlaces genéticos con fenotipos de enfermedad humana son bien conocidos por los especialistas en la materia. Como referencia sobre los métodos basados en la PCR utilizados en el diagnóstico, véanse, en general, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek y Walaszek (ed.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998) y Meltzer (ed.), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998)).

Las mutaciones asociadas con el locus del Zcyto21 pueden detectarse usando moléculas de ácido nucleico de la presente invención con métodos estándar para el análisis de mutación directo, tales como análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, análisis de las repeticiones en tándem cortos con técnicas de PCR, análisis del sistema de mutaciones resistentes a la amplificación, detección de polimorfismo de la conformación monocatenaria, métodos de segmentación por RNasa, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, análisis de faltas de coincidencia con fluorescencia y otras técnicas de análisis genético conocidas en la especialidad (véanse, por ejemplo, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman y Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren *et al.* (ed.), *Genome Analysis, vol. 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli *et al.* (ed.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley & Sons 1998) y Richards y Ward, "Molecular Diagnostic Testing", en *Principles of Molecular Medicine*, páginas 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)). El análisis directo de un gen Zcyto21 en relación con una mutación puede realizarse utilizando el ADN genómico de un sujeto. Los métodos para amplificar el ADN genómico obtenido, por ejemplo, de linfocitos de la sangre periférica, son bien conocidos por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Dracopoli *et al.* (ed.), *Current Protocols in Human Genetics*, en las páginas 7.1.6 a 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)).

Dentro de las aplicaciones de la invención, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el Zcyto21 pueden hibridarse en condiciones rigurosas con moléculas de ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, a moléculas de ácido nucleico con la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58 a 603 de la SEC. ID. N.º 1, o a moléculas de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos complementaria a la SEC. ID. N.º 1. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser alrededor de 5°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica y un pH definidos. El T_m es la temperatura (a una concentración iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia de acceso se hibrida con una sonda que coincide perfectamente.

Un par de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, puede hibridarse si las secuencias de nucleótidos tienen cierto grado de complementariedad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases con faltas de coincidencia en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido se ve influenciada por el grado de falta de coincidencia. El T_m del híbrido no coincidente disminuye 1°C por cada 1 a 1,5% de falta de coincidencia en los pares de bases. Variar la rigurosidad de las condiciones de la hibridación permite controlar el grado de falta de coincidencia que se presentará en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta a medida que aumenta la temperatura de hibridación y disminuye la concentración iónica de la solución amortiguadora de hibridación.

Un especialista en la materia cuenta con la capacidad suficiente para adaptar estas condiciones para usarlas con el híbrido de un polinucleótido en particular. El T_m para una secuencia de acceso específica es la temperatura (en condiciones definidas) a la cual el 50% de la secuencia de acceso se hibridará a una secuencia de sondas que coincide perfectamente. Las condiciones que influyen en el T_m incluyen el tamaño y el contenido de pares de bases de la sonda

de polinucleótidos, la concentración iónica de la solución de hibridación y la presencia de agentes desestabilizantes en la solución de hibridación. Se conocen en la especialidad numerosas ecuaciones para calcular el T_m , y estas son específicas para híbridos de ADN, ARN y ADN-ARN y secuencias de sondas de polinucleótidos de longitud variable (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel *et al.*, (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (ed.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227 (1990)). Existe software para análisis de secuencias, por ejemplo, OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como sitios en internet, para analizar una secuencia dada y calcular el T_m en función de criterios definidos por el usuario. Dichos programas también analizan una secuencia dada en condiciones definidas e identifican secuencias de sondas adecuadas. Habitualmente, la hibridación de secuencias de polinucleótidos más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas de alrededor de entre 20 y 25°C por debajo del T_m calculado. Para sondas más pequeñas, <50 pares de bases, la hibridación habitualmente se lleva a cabo al T_m , o entre 5 y 10°C por debajo del T_m calculado. Esto brinda la máxima tasa de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN.

Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas o en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas habituales incluyen lavado en una solución de 0,5x - 2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a 55 - 65°C. A manera de ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido del Zcyto21 se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x - 2x SSC con SDS al 0,1% a 55 - 65°C e incluye 0,5x SSC con SDS al 0,1% a 55°C, o 2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C. Un especialista en la materia puede fácilmente idear condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSC por SSPE en la solución de lavado.

Las condiciones de lavado muy rigurosas habituales incluyen el lavado en una solución de 0,1x - 0,2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a 50 - 65°C. En otras palabras, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido del Zcyto21 se hibridan con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x - 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50 - 65°C e incluye 0,1x SSC con SDS al 0,1% a 50°C o 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C.

La presente invención también proporciona polipéptidos del Zcyto21 aislados que tienen una identidad de secuencias sustancialmente similar a los polipéptidos de la SEC. ID. N.º 2 o sus ortólogos. El término "identidad de secuencias sustancialmente similar" se usa en la presente para denotar polipéptidos que comprenden una identidad de secuencias de, al menos, un 70%; al menos, un 80%; al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con las secuencias mostradas en la SEC. ID. N.º 2 o sus ortólogos. La presente invención también incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de, al menos, un 90% o 95%; o más del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de residuos de aminoácidos 1 a 200 ó 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2. La presente invención también incluye moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos. A continuación se describen métodos para determinar el porcentaje de identidad.

La presente invención también contempla variantes de las moléculas de ácido nucleico del Zcyto21 que se puedan identificar aplicando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2 y/o una valoración de hibridación, según se ha descrito más arriba. Dichas variantes del Zcyto21 incluyen las moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x - 2x SSC con SDS al 0,1% a 55 - 65°C; o (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, al menos, un 70%; al menos, un 80%; al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2. Como alternativa, las variantes del Zcyto21 pueden caracterizarse como moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x - 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50 - 65°C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, al menos, un 70%; al menos, un 80%; al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2.

El porcentaje de identidad de secuencias se determina por métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48:603 (1986), y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar los puntajes de alineamiento utilizando una penalización por apertura de gap de 10, una penalización por extensión de gap de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican por los códigos de una sola letra estándar).

Cantidad total de coincidencias idénticas

x 100

[longitud de la secuencia más larga más cantidad de gaps introducidos
en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 3

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

A 4
R-1 5
N-2 0 6
D-2-2 1 6
C 0-3-3-3 9
Q-1 1 0 0-3 5
E-1 0 0 2-4 2 5
G 0-2 0-1-3-2-2 6
H-2 0 1-1-3 0 0-2 8
I-1-3-3-3-1-3-3-4-3 4
L-1-2-3-4-1-2-3-4-3 2 4
K-1 2 0-1-3 1 1-2-1-3-2 5
M-1-1-2-3-1 0-2-3-2 1 2-1 5
F-2-3-3-3-2-3-3-3-1 0 0-3 0 6
P-1-2-2-1-3-1-1-2-2-3-3-1-2-4 7
S 1-1 1 0-1 0 0 0-1-2-2 0-1-2-1 4
T 0-1 0-1-1-1-1-2-2-1-1-1-1-2-1 1 5
W-3-3-4-4-2-2-3-2-2-3-2-3-1 1-4-3-2 1 1
Y-2-2-3-2-1-2-3 2-1-1-2-1-1-2-1 3-3-2-2 2 7
V 0-3-3-3-1-2-2-3-3 1-2 1-1-2-2 0-3-1 4

ES 2 286 128 T3

Los especialistas en la materia apreciarán que existen muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos divulgada en la presente y la secuencia de aminoácidos de una variante putativa del Zcyto21. El algoritmo FASTA ha sido descrito por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

En resumen, el FastA primero caracteriza la similitud entre secuencias identificando las regiones compartidas por la secuencia de consulta (p. ej., SEC. ID. N.º 2) y una secuencia de prueba que tienen la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin tener en cuenta sustituciones, inserciones o eliminaciones conservadoras de aminoácidos. Luego, se vuelven a puntuar las diez regiones con la mayor densidad de identidades comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados mediante una matriz de sustitución de aminoácidos, y se "recortan" los extremos de las regiones para incluir únicamente aquellos residuos que contribuyan a la mayor puntuación. Si hay varias regiones con puntajes mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada en función de la longitud de la secuencia y el valor de ktup), las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con gaps. Finalmente, las regiones con la mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean mediante una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), que permite las inserciones y eliminaciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos del análisis por el método FASTA son: ktup=1, penalización por apertura de gap=10, penalización por extensión de gap=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

El FASTA también puede utilizarse para determinar la identidad de secuencias de moléculas de ácido nucleico utilizando una relación, tal como se ha divulgado más arriba. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis; preferentemente entre tres y seis; más preferentemente tres, con los demás parámetros fijados como predeterminados.

Los polipéptidos de variantes del Zcyto21 o los polipéptidos con una identidad de secuencias sustancialmente similar se caracterizan por tener una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferentemente de una naturaleza menor, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos (véase la Tabla 4) y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento o la actividad del polipéptido; eliminaciones pequeñas, generalmente de entre aproximadamente uno y 30 aminoácidos; y extensiones amino o carboxilo terminales, como un residuo de metionina amino terminal, un péptido ligador pequeño de aproximadamente 20-25 residuos, o una etiqueta de afinidad. Por ende, la presente invención incluye polipéptidos de entre aproximadamente 149 y 230 residuos de aminoácidos que comprenden una secuencia que es idéntica en, al menos, un 70%; preferentemente, al menos un 90%; y más preferentemente, un 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más a la correspondiente región de la SEC. ID. N.º 2. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad también pueden comprender un sitio de segmentación proteolítica entre el polipéptido del Zcyto21 y la etiqueta de afinidad. Los sitios preferidos incluyen sitios de segmentación de trombina y sitios de segmentación del factor Xa.

TABLA 4

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

45	Básica:	arginina lisina histidina
50	Ácida:	ácido glutámico ácido aspártico
55	Polar:	glutamina asparragina
60	Hidrófoba:	leucina isoleucina valina
65	Aromática:	fenilalanina triptófano tirosina

ES 2 286 128 T3

TABLA 4 (continuación)

Pequeña:

glicina
alanina
serina
treonina
metionina

5

10

Puede realizarse una determinación de los residuos de aminoácidos que comprenden regiones o dominios que son fundamentales para mantener la integridad estructural. Dentro de estas regiones, se pueden determinar los residuos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantendrán la estructura terciaria general de la molécula. Los métodos para analizar la estructura de la secuencia incluyen, a modo de ejemplo, el alineamiento de múltiples secuencias con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos, propensiones de estructura secundaria, patrones binarios, compactación complementaria e interacciones polares ocultas (Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5:372-376, 1995 y Cordes *et al.*, *Current Opin. Struct. Biol.* 6:3-10, 1996). En general, al diseñar modificaciones a moléculas o identificar fragmentos específicos, la determinación de la estructura estará acompañada por la evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

15

20

Se realizan cambios en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos del Zcyto21, a fin de minimizar la alteración de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el polipéptido del Zcyto21 comprenda una o más hélices, se realizarán cambios en los residuos de aminoácidos, de forma tal de no alterar la geometría de las hélices y otros componentes de la molécula donde los cambios en la conformación disminuyan alguna función fundamental, por ejemplo, la unión de la molécula a sus elementos de unión. Los efectos de los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, mediante el uso de modelos de ordenador como se divulga más arriba, o pueden determinarse mediante el análisis de la estructura de cristales (véase, p. ej., Laphorn *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 2:266-268, 1995). Otras técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia comparan el plegamiento de una variante de proteína con una molécula estándar (p. ej., la proteína original). Por ejemplo, puede realizarse una comparación del patrón de cisteínas en una variante de las moléculas y en moléculas estándar. La espectrometría de masas y la modificación química que utilizan la reducción y la alquilación proporcionan métodos para determinar residuos de cisteína asociados con las uniones disulfuro o libres de dichas asociaciones (Bean *et al.*, *Anal. Biochem.* 201:216-226, 1992; Gray, *Protein Sci.* 2:1732-1748, 1993; y Patterson *et al.*, *Anal. Chem.* 66:3727-3732, 1994). Generalmente, se cree que si una molécula modificada no tiene el mismo patrón de cisteínas que la molécula estándar, el plegamiento podría verse afectado. Otro método bien conocido y aceptado para la medición del plegamiento es el dicróismo circular (circular dichroism, CD). La medición y comparación del espectro del CD generado por una molécula modificada y una molécula estándar es el procedimiento de rutina (Johnson, *Proteins* 7:205-214, 1990). La cristalografía es otro método bien conocido para el análisis del plegamiento y la estructura. La resonancia magnética nuclear (nuclear magnetic resonance, NMR), el mapeo de péptidos digestivos y el mapeo de epítopos también son métodos conocidos para el análisis de las similitudes en cuanto al plegamiento y la estructura entre las proteínas y los polipéptidos (Schaanan *et al.*, *Science* 257:961-964, 1992).

25

30

35

40

45

50

Puede generarse un perfil de hidrofiliidad de Hopp/Woods de la secuencia de proteínas del Zcyto21 como se muestra en la SEC. ID. N.º 2 (Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth.* 88:1-18, 1986 y Triquier *et al.*, *Protein Engineering* 11:153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana desplazable de seis residuos. Se ignoraron los residuos ocultos G, S y T y los residuos expuestos H, Y y W. Por ejemplo, en el Zcyto21, las regiones hidrófilas incluyen los residuos 155 (Glu) a 160 (Glu); los residuos 51 (Lys) a 56 (Ala); los residuos 50 (Phe) a 55 (Asp); los residuos 140 (Pro) a 145 (Arg); y los residuos 154 (Gln) a 159 (Lys); como se muestra en la SEC. ID. N.º 2.

55

Los especialistas en la materia reconocerán que la hidrofiliidad o hidrofobicidad se tomarán en cuenta al diseñar modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del Zcyto21, de forma tal de no alterar el perfil estructural y biológico general. De particular interés para el reemplazo son los residuos hidrófobos seleccionados del grupo que consiste en Val, Leu e Ile, o el grupo que consiste en Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp.

60

Las identidades de los aminoácidos esenciales también puede inferirse a partir del análisis de la similitud de secuencias entre el INF- α y otros interferones. Mediante el uso de métodos como el análisis "FASTA" descrito anteriormente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se las utiliza para analizar la secuencia de aminoácidos a fin de detectar las regiones conservadas. Un enfoque alternativo para identificar una variante del polinucleótido del Zcyto21 en función de la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica una posible variante del gen Zcyto21 puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, como se analizó más arriba.

65

Otros métodos para identificar los aminoácidos esenciales de los polipéptidos de la presente invención son los procedimientos conocidos en la especialidad, como la mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis por cribaje de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244:1081 (1989), Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498 (1991), Coombs

y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula y se prueban las moléculas mutantes resultantes a fin de determinar su actividad biológica o bioquímica como se divulga a continuación, para identificar residuos de aminoácidos que resultan fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

La presente invención también incluye fragmentos funcionales de polipéptidos del Zcyto21 y moléculas de ácido nucleico que codifican dichos fragmentos funcionales. Un Zcyto21 "funcional", o un fragmento de este, según lo definido en la presente, se caracteriza por su actividad proliferativa o de diferenciación, por su capacidad de inducir o inhibir funciones celulares especializadas, o por su capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo contra el Zcyto21 o un receptor del Zcyto21 (ya sea soluble o inmovilizado). Como se describió previamente en la presente, el Zcyto21 se caracteriza por una estructura con un haz de seis hélices que comprende lo siguiente: la hélice A está definida por los residuos de aminoácidos 49 (Ser) a 63 (Leu); la hélice B, por los residuos de aminoácidos 76 (Asn) a 84 (Val); la hélice C, por los residuos de aminoácidos 89 (Val) a 104 (Ala); la hélice D, por los residuos de aminoácidos 111 (Glu) a 133 (Gln); la hélice E, por los residuos de aminoácidos 137 (Thr) a 158 (Lys); y la hélice F, por los residuos de aminoácidos 163 (Gly) a 189 (Leu); como se muestra en la SEC. ID. N.º 2. Por ende, la presente invención también comprende las proteínas de fusión que incluyen: (a) moléculas de polipéptidos que comprenden una o más de las hélices descritas más arriba; y (b) fragmentos funcionales que comprenden una o más de estas hélices. A la otra porción de polipéptidos de la proteína de fusión se le puede agregar otra citocina o interferón con haz helicoidal, como el INF- α , o un péptido señal de secreción no original y/o no relacionado que facilite la secreción de la proteína de fusión.

Los polipéptidos del Zcyto21 de la presente invención, incluidos los polipéptidos de longitud completa, los fragmentos biológicamente activos y los polipéptidos de fusión, pueden producirse de acuerdo con las técnicas convencionales usando células en las que se introdujo un vector de expresión que codifica el polipéptido. Tal como se lo usa en la presente, el término "células en las que se introdujo un vector de expresión" incluye las células que se han manipulado directamente mediante la introducción de moléculas de ADN exógeno, y la progenie de dichas células que contiene el ADN introducido. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y hacerse crecer en medio de cultivo, e incluyen células bacterianas, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Las técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en diversas células huésped se divulgan en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido del Zcyto21 se liga operablemente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, entre los que generalmente se incluyen un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. Por lo general, el vector también contendrá uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los especialistas en la materia reconocerán que dentro de determinados sistemas pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse mediante la integración dentro del genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño de rutina dentro de los conocimientos generales de la materia. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido del Zcyto21 hacia la vía de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal de secreción puede ser la del Zcyto21, o puede derivar de otra proteína segregada (p. ej., t-PA; véase la Patente de los EE. UU. N.º 5.641.655) o puede sintetizarse *de novo*. La secuencia señal de secreción está ligada operablemente a la secuencia de ADN del Zcyto21, es decir, ambas secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y posicionadas para dirigir el polipéptido nuevo sintetizado hacia la vía de secreción de la célula huésped. Las secuencias señal de secreción comúnmente están en posición 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señal pueden estar posicionadas en otro lugar de la secuencia de ADN de interés (véanse, p. ej., Welch *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 5.037.743; Holland *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 5.143.830).

En la presente invención, pueden utilizarse como huéspedes células cultivadas de mamíferos. Los métodos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamíferos incluyen la transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler *et al.*, *Cell* 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973), la electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1:841-845, 1982), la transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, *ibid.*) y la transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone *et al.*, *Focus* 15:80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células cultivadas de mamíferos se divulga, por ejemplo, en Levinson *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.713.339; Hagen *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.784.950; Palmiter *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.579.821; y Ringold, Patente de los EE. UU. N.º 4.656.134. Las células cultivadas de mamíferos adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC N.º CRL 1650), COS-7 (ATCC N.º CRL 1651), BHK (ATCC N.º CRL 1632), BHK 570 (ATCC N.º CRL 10314), 293 (ATCC N.º CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977) y de ovario de hámster chino (p. ej., CHO-K1, ATCC N.º CCL 61; o CHO DG44, Chasin *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986). Existen otras líneas celulares adecuadas conocidas en la especialidad y que pueden obtenerse a través de depósitos públicos como la Colección Estadounidense

de Cultivos de Tipos (American Type Culture Collection), Manassas, VA. En general, se prefieren los promotores de la transcripción fuertes, como los promotores obtenidos del SV-40 o del citomegalovirus. Véase, p. ej., la Patente de los EE. UU. N.º 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los genes de la metalotioneína (Patentes de los EE. UU. N.º 4.579.821 y 4.601.978) y el principal promotor tardío del adenovirus. Los vectores de expresión utilizados en las células de mamíferos incluyen el pZP-1 y el pZP-9, que se encuentran en depósito en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos, Manassas, VA, EE. UU., con los números de acceso 98669 y 98668, respectivamente; y derivados de estos.

Generalmente, se utiliza la selección por fármaco a fin de seleccionar células cultivadas de mamíferos en las que se ha introducido ADN extraño. Dichas células suelen denominarse “transfectantes”. Las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y pueden pasar el gen de interés a su progenie se denominan “transfectantes estables”. Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica la resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco del tipo de la neomicina, por ejemplo, el G-418 o un fármaco similar. Los sistemas de selección también pueden usarse para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, proceso conocido como “amplificación”. La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y luego aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También pueden utilizarse otros genes de resistencia a fármacos (p. ej., resistencia a la higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa).

El sistema del adenovirus también puede utilizarse para la producción de proteínas *in vitro*. Cultivando células que no sean 293 infectadas por el adenovirus en condiciones en las que las células no se dividan rápidamente, las células pueden producir proteínas durante períodos prolongados. Por ejemplo, se cultivan células BHK para que confluyan en fábricas de células, que luego se exponen al vector adenoviral que codifica la proteína segregada de interés. Luego, las células se cultivan en condiciones sin suero, lo que permite que las células infectadas sobrevivan durante varias semanas sin una división celular significativa. En un método alternativo, pueden cultivarse células 293 infectadas por el vector adenovirus como células adherentes o en cultivo en suspensión a una densidad celular relativamente alta para producir cantidades de proteína significativas (véase Garnier *et al.*, *Cytotechnol.* 15:145-55, 1994). Con cualquiera de los dos protocolos, puede aislarse reiteradamente una proteína heteróloga expresada y segregada, a partir de sobrenadante, lisado o fracciones de membrana de cultivo celular, según la disposición de la proteína expresada en la célula. Dentro del protocolo de producción de células 293 infectadas, también pueden obtenerse en forma efectiva proteínas no segregadas.

Pueden infectarse células de insectos con baculovirus recombinante, comúnmente derivado del virus de la polioedrosis nuclear de la *Autographa californica* (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) de acuerdo con los métodos conocidos en la especialidad. Dentro de un método preferido, se produce baculovirus recombinante mediante el uso de un sistema basado en transposones descrito por Luckow *et al.* (*J. Virol.* 67:4566-4579, 1993). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se comercializa en forma de equipo (equipo Bac-to-Bac™; Life Technologies, Rockville, MD). El vector de transferencia (p. ej., pFastBac1™; Life Technologies) contiene un transposón Tn7 para trasladar el ADN que codifica la proteína de interés a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un gran plásmido denominado “bácmido”. Véanse, Hill-Perkins y Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971-976, 1990; Bonning *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1551-1556, 1994; y Chazenbalk y Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543-1549, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro del marco con ADN que codifica una extensión de polipéptidos o una etiqueta de afinidad según lo divulgado más arriba. Utilizando técnicas conocidas en la especialidad, un vector de transferencia que contiene una secuencia que codifica el Zcyto21 se transforma en células huésped de *E. coli*, y las células se criban para detectar bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido que indica baculovirus recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla usando las técnicas habituales, y se lo utiliza para transfectar las células de *Spodoptera frugiperda*, como las células Sf9. Luego, se produce el virus recombinante que expresa la proteína del Zcyto21. Se elaboran lotes de virus recombinante mediante métodos utilizados comúnmente en la especialidad.

Para la producción de proteínas, el virus recombinante se utiliza para infectar las células huésped, generalmente una línea celular derivada del gusano cogollero de otoño, *Spodoptera frugiperda* (p. ej., células Sf9 o Sf21) o *Trichoplusia ni* (p. ej., células High Five™; Invitrogen, Carlsbad, CA). Véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. N.º 5.300.435. Se utiliza un medio sin suero para cultivar y mantener las células. Las formulaciones del medio adecuadas son conocidas en la especialidad y pueden obtenerse a través de proveedores comerciales. Las células se cultivan desde una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10⁵ células a una densidad de 1-2 x 10⁶ células, en cuyo momento se agrega un lote de virus recombinante a una multiplicidad de infección (multiplicity of infection, MOI) de 0,1 a 10, más habitualmente cerca de 3. Los procedimientos utilizados generalmente son conocidos en la especialidad.

También pueden utilizarse como huéspedes otras células eucariotas superiores, incluidas células de origen vegetal y células aviarias. El uso de la *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar los genes en las células de origen vegetal ha sido analizado por Sinkar *et al.*, *J. Biosci. (Bangalore)* 11:47-58, 1987.

Las células fúngicas, incluidas las células de levaduras, también pueden utilizarse dentro de la presente invención. Las especies de levaduras de interés en tal sentido incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia*

methanolica. Los métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de ellas se divulgan, por ejemplo, en Kawasaki, Patente de los EE. UU. N.º 4.599.311; Kawasaki *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.931.373; Brake, Patente de los EE. UU. N.º 4.870.008; Welch *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 5.037.743; y Murray *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a los fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente en particular (p. ej., leucina). Un sistema de vectores preferido para usar en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vectores *POT1* divulgado por Kawasaki *et al.* (Patente de los EE. UU. N.º 4.931.373), que permite seleccionar las células transformadas por cultivo en un medio que contenga glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para usar en levaduras incluyen los genes de enzimas glucolíticas (véanse, p. ej., Kawasaki, Patente de los EE. UU. N.º 4.599.311; Kingsman *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.615.974; y Bitter, Patente de los EE. UU. N.º 4.977.092) y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véanse también, las Patentes de los EE. UU. N.º 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454. En la especialidad, se conocen los sistemas de transformación para otras levaduras, incluidas *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986; Cregg, Patente de los EE. UU. N.º 4.882.279; y Raymond *et al.*, *Yeast* 14, 11-23, 1998. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* según los métodos de McKnight *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 4.935.349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* han sido divulgados por Sumino *et al.*, Patente de los EE. UU. N.º 5.162.228. Los métodos para transformar *Neurospora* han sido divulgados por Lambowitz, Patente de los EE. UU. N.º 4.486.533. La producción de proteínas recombinantes en *Pichia methanolica* se divulga en las Patentes de los EE. UU. N.º 5.716.808, 5.736.383, 5.854.039 y 5.888.768.

Las células huésped procariotas, incluidas las cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, también son células huésped útiles dentro de la presente invención. Las técnicas para transformar estos huéspedes y expresar las secuencias de ADN extraño clonadas en dichos huéspedes son bien conocidas en la especialidad (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido del Zcyto21 en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, el polipéptido puede ser retenido en el citoplasma, habitualmente en forma de gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, se recuperan los gránulos y se los desnaturaliza con, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado luego puede replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, por ejemplo, por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina amortiguada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional alterando las células (por ejemplo, por sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalizar y replegar.

Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con los procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped elegidas. Se conocen en la especialidad diversos medios adecuados, incluidos los medios definidos y medios complejos, que generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de crecimiento generalmente selecciona células que contienen el ADN agregado en forma exógena por, a modo de ejemplo, selección por fármaco o por deficiencia en un nutriente esencial, que es complementado por el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o cotransfectado en la célula huésped. Se proporcionan cultivos líquidos con suficiente aireación a través de medios convencionales, como la agitación de matraces pequeños o la agitación con aire de fermentadores.

Se prefiere purificar los polipéptidos y las proteínas de la presente invención hasta una pureza de $\geq 80\%$; más preferentemente, $\geq 90\%$; aún más preferentemente, $\geq 95\%$; y particularmente se prefiere un estado farmacéuticamente puro, que es una pureza mayor del 99,9% con respecto a las macromoléculas contaminantes, en particular, otras proteínas y ácidos nucleicos, y sin agentes infecciosos y pirogénicos. Preferentemente, un polipéptido o una proteína purificados prácticamente no contienen otros polipéptidos o proteínas, particularmente aquellos de origen animal.

Las proteínas del Zcyto21 recombinante expresadas (incluidos los polipéptidos quiméricos y las proteínas multiméricas) se purifican mediante métodos convencionales de purificación de proteínas, generalmente mediante una combinación de técnicas cromatográficas. Véanse, en general, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988; y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York, 1994. Las proteínas que comprenden una etiqueta de afinidad de polihistidina (generalmente alrededor de 6 residuos de histidina) se purifican mediante cromatografía de afinidad en una resina quelante de níquel. Véase, por ejemplo, Houchuli *et al.*, *Bio/Technol.* 6: 1321-1325, 1988. Las proteínas que comprenden una etiqueta glu-glu pueden purificarse mediante cromatografía de inmunoafinidad de acuerdo con los procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Grussenmeyer *et al.*, *ibid.* Las fusiones de proteínas de unión a maltosa se purifican en una columna de amilosa de acuerdo con los métodos conocidos en la especialidad.

Los polipéptidos del Zcyto21 también pueden prepararse mediante síntesis química de acuerdo con los métodos conocidos en la especialidad, entre los que se incluyen la síntesis en fase sólida exclusiva, los métodos de fase sólida parcial, la condensación de fragmentos o la síntesis de soluciones clásica. Véanse, por ejemplo, Merrifield, *J. Am.*

Chem. Soc. 85:2149, 1963; Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* (2.a edición), Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3, 1986; y Atherton *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989. La síntesis *in vitro* resulta particularmente ventajosa para la preparación de polipéptidos más pequeños.

5

Utilizando los métodos conocidos en la especialidad, las proteínas del Zcyto21 pueden prepararse como monómeros o multímeros; glucosilados o no glucosilados; pegilados o no pegilados; y pueden incluir o no un residuo de aminoácido metionina inicial.

10

Las células diana que pueden utilizarse en las valoraciones de la actividad del Zcyto21 incluyen, a modo de ejemplo, células vasculares (especialmente las células endoteliales y las células del músculo liso), células hematopoyéticas (mieloides y linfoides), células hepáticas (incluidos los hepatocitos, las células endoteliales fenestradas, las células de Kupffer y las células de Ito), fibroblastos (incluidos los fibroblastos dérmicos y los fibroblastos pulmonares humanos), células pulmonares fetales, sinoviocitos articulares, pericitos, condrocitos, osteoblastos y células epiteliales prostáticas. Las células endoteliales y las células hematopoyéticas derivan de una célula ancestral común, el hemangioblasto (Choi *et al.*, *Development* 125:725-732, 1998).

15

Las proteínas del Zcyto21 de la presente invención se caracterizan por su actividad, es decir, la modulación de la proliferación, la diferenciación, la migración, la adhesión o el metabolismo de los tipos celulares que responden. La actividad biológica de las proteínas del Zcyto21 se analiza utilizando valoraciones *in vitro* o *in vivo* diseñadas para detectar la proliferación, diferenciación, migración o adhesión celular; o los cambios en el metabolismo celular (p. ej., la producción de otros factores de crecimiento u otras macromoléculas). Se conocen en la especialidad muchas valoraciones adecuadas, y las valoraciones representativas se divulgan en la presente. Las valoraciones que utilizan células cultivadas son las más convenientes para el cribaje, por ejemplo, para determinar los efectos de las sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos. No obstante, en vista de la complejidad de los procesos de desarrollo (p. ej., la angiogénesis y la cicatrización de heridas), generalmente se utilizarán valoraciones *in vivo* para confirmar y caracterizar más detalladamente la actividad biológica. Determinados modelos *in vitro*, como el modelo de matriz de gel de colágeno tridimensional de Pepper *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189:824-831, 1992), son lo suficientemente complejos como para analizar los efectos histológicos. Las valoraciones pueden realizarse utilizando proteínas producidas en forma exógena, o pueden llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro* utilizando células que expresen el(los) polipéptido(s) de interés. Las valoraciones pueden realizarse utilizando proteínas del Zcyto21 solas o en combinación con otros factores de crecimiento, como miembros de la familia del VEGF o citocinas hematopoyéticas (p. ej., EPO, TPO, G-CSF, factor de células progenitoras). Las valoraciones representativas se divulgan a continuación.

35

La actividad de las proteínas del Zcyto21 puede medirse *in vitro* utilizando células cultivadas o *in vivo* administrando moléculas de la invención reivindicada a un modelo animal apropiado. Las valoraciones que miden la proliferación o diferenciación celular son bien conocidas en la especialidad. Por ejemplo, las valoraciones que miden la proliferación incluyen valoraciones tales como la quimiosensibilidad al colorante rojo neutro (Cavanaugh *et al.*, *Investigational New Drugs* 8:347-354, 1990), la incorporación de nucleótidos marcados radiactivamente (como se divulga, p. ej., en Raines y Ross, *Methods Enzymol.* 109:749-773, 1985; Wahl *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8:5016-5025, 1988; y Cook *et al.*, *Analytical Biochem.* 179:1-7, 1989), la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferantes (Porstmann *et al.*, *J. Immunol. Methods* 82:169-179, 1985), y el uso de sales de tetrazolio (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983; Alley *et al.*, *Cancer Res.* 48:589-601, 1988; Marshall *et al.*, *Growth Reg.* 5:69-84, 1995; y Scudiero *et al.*, *Cancer Res.* 48:4827-4833, 1988). La diferenciación puede analizarse utilizando células precursoras adecuadas que puedan inducirse de modo tal que se diferencien en un fenotipo más maduro. Las valoraciones que miden la diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores de superficie celular asociados con la expresión de un tejido específica de una etapa, la actividad enzimática, la actividad funcional o los cambios morfológicos (Watt, *FASEB*, 5:281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57:63-75, 1994; Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 161-171, 1989; incorporados en la presente por referencia).

50

La actividad del Zcyto21 también puede detectarse utilizando valoraciones diseñadas para medir la producción inducida por el Zcyto21 de uno o más factores de crecimiento u otras macromoléculas adicionales. Estas valoraciones preferidas incluyen aquellas destinadas a determinar la presencia del factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor, HGF), el factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF), el factor de crecimiento de transformación alfa (transforming growth factor alpha, TGF α), la interleucina 6 (IL-6), el VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos ácidos (acidic fibroblast growth factor, aFGF), la angiogenina y otras moléculas producidas por el hígado. Las valoraciones adecuadas incluyen: valoraciones de mitogénesis que utilizan células diana que responden a la macromolécula de interés, valoraciones de unión a receptores, valoraciones de unión de competencia, valoraciones inmunológicas (p. ej., ELISA) y otros formatos conocidos en la especialidad. La secreción de metaloproteasas se mide a partir de fibroblastos dérmicos, sinoviocitos y condrocitos humanos primarios tratados. Los niveles relativos de colagenasa, gelatinasa y estromalisina producidos en respuesta al cultivo en presencia de una proteína del Zcyto21 se miden utilizando geles de zimograma (Loita y Stetler-Stevenson, *Cancer Biology* 1:96-106, 1990). La síntesis de procolágeno/colágeno realizada por los fibroblastos dérmicos y los condrocitos en respuesta a una proteína de prueba se mide utilizando la incorporación de ³H-prolina en un colágeno dodecilo naciente. El colágeno marcado con ³H se visualiza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) seguida de autorradiografía (Unemori y Amento,

65

5 *J. Biol. Chem.* 265: 10681-10685, 1990). La secreción de glucosaminoglucano (GAG) de los fibroblastos dérmicos y los condrocitos se mide utilizando una valoración de unión a colorante azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 883:173-177, 1986). También se realizan valoraciones de colágeno y GAG en presencia de IL-1 α o TGF- α para examinar la capacidad de la proteína del Zcyto21 de modificar las respuestas establecidas a estas citocinas.

10 Se realizan valoraciones de activación de monocitos (1) para observar la capacidad de las proteínas del Zcyto21 de estimular aún más la activación de monocitos, y (2) para examinar la capacidad de las proteínas del Zcyto21 de modular la activación de monocitos inducida mediante unión o inducida mediante endotoxinas (Fuhlbrigge *et al.*, *J. Immunol.* 138: 3799-3802, 1987). Los niveles de IL-1 α y TNF α producidos en respuesta a la activación se miden mediante ELISA (Biosource, Inc. Camarillo, CA). Las células monocitos/macrófagos, en virtud del CD14 (receptor de LPS), son intensamente sensibles a la endotoxina, y las proteínas con niveles moderados de actividad similar a la de las endotoxinas activarán estas células.

15 La actividad hematopoyética de las proteínas del Zcyto21 puede analizarse en diversas células hematopoyéticas en cultivo. Las valoraciones preferidas incluyen valoraciones de colonias de la médula ósea primarias y valoraciones de colonias restringidas por el linaje de una etapa posterior, conocidas en la especialidad (p. ej., Holly *et al.*, Publicación de la WIPO WO 95/21920). Se siembran células de la médula ósea en un medio semisólido adecuado (p. ej., 50% de metilcelulosa que contiene 15% de suero bovino fetal, 10% de albúmina sérica bovina, y 0,6% de mezcla de antibióticos PSN) y se las incuba en presencia del polipéptido de prueba, para luego examinarlas microscópicamente a fin de analizar la formación de colonias. Se utilizan como controles factores hematopoyéticos conocidos. La actividad mitogénica de los polipéptidos del Zcyto21 en las líneas celulares hematopoyéticas puede medirse tal como se ha divulgado más arriba.

20 La migración celular se analiza esencialmente según lo divulgado por Kähler *et al.* (*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:932-939, 1997). Se considera que una proteína es quimiotáctica si induce la migración de células de un área de baja concentración de proteínas a un área de alta concentración de proteínas. Se realiza una valoración típica utilizando cámaras de Boyden modificadas con una membrana de poliestireno que separa las dos cámaras (Transwell; Corning Costar Corp.). La muestra de prueba, diluida en un medio que contiene BSA al 1%, se agrega en la cámara más baja de una placa de 24 pocillos que contiene Transwells. Luego, las células se colocan sobre el inserto Transwell pretratado con gelatina al 0,2%. La migración celular se mide después de 4 horas de incubación a 37°C. Las células que no migran se retiran de la parte superior de la membrana Transwell, y las células adheridas a la cara inferior de la membrana se fijan y tiñen con violeta cristal al 0,1%. A continuación, se extraen las células teñidas con ácido acético al 10% y se mide la absorbancia a 600 nm. Luego, se calcula la migración a partir de una curva de calibración estándar. La migración celular también puede medirse utilizando el método matrigel de Grant *et al.* ("Angiogenesis as a component of epithelial-mesenchymal interactions" en Goldberg y Rosen, *Epithelial-Mesenchymal Interaction in Cancer*, Birkhäuser Verlag, 1995, 235-248; Baatout, *Anticancer Research* 17:451-456, 1997).

25 La actividad de adhesión celular se analiza esencialmente según lo divulgado por LaFleur *et al.* (*J. Biol. Chem.* 272:32798-32803, 1997). En resumen, las placas de microtitulación se recubren con la proteína de prueba, los sitios no específicos se bloquean con BSA, y las células (como las células del músculo liso, los leucocitos o las células endoteliales) se siembran a una densidad de aproximadamente 10⁴-10⁵ células/pocillo. Los pocillos se incuban a 37°C (generalmente durante alrededor de 60 minutos), y luego se extraen las células no adherentes mediante un lavado suave. Las células adheridas se cuantifican mediante métodos convencionales (p. ej., tiñendo con violeta cristal, lisando las células y determinando la densidad óptica del lisado). Los pocillos de control se recubren con una proteína adhesiva conocida, como la fibronectina o la vitronectina.

30 La actividad de las proteínas del Zcyto21 puede medirse mediante un microfisiómetro biosensor con base de sílice, que mide la tasa de acidificación extracelular o la excreción de protones asociada con la unión a receptores y las respuestas fisiológicas celulares posteriores. Un ejemplo de dicho dispositivo es el microfisiómetro CytosensorTM fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Con este método es posible medir una serie de respuestas celulares, por ejemplo, proliferación celular, transporte iónico, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación de la regulación y de los receptores, y similares. Véanse, por ejemplo, McConnell *et al.*, *Science* 257:1906-1912, 1992; Pitchford *et al.*, *Meth. Enzymol.* 228:84-108, 1997; Arimilli *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 212:49-59, 1998; y Van Liefde *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 346:87-95, 1998. El microfisiómetro puede usarse para hacer valoraciones de células eucariotas o procariotas, adherentes o no adherentes. Al medir los cambios de la acidificación extracelular en los medios celulares en el tiempo, el microfisiómetro mide directamente las respuestas celulares a diversos estímulos, incluidas las proteínas del Zcyto21, sus agonistas y antagonistas. Preferentemente, el microfisiómetro se utiliza para medir las respuestas de una célula eucariota que responde al Zcyto21, en comparación con una célula eucariota de control que no responde al polipéptido del Zcyto21. Las células eucariotas que responden al Zcyto21 comprenden células a las que se ha transfectado un receptor del Zcyto21, creando de esta forma una célula que responde al Zcyto21, así como células que responden naturalmente al Zcyto21. Las diferencias, medidas por un cambio, por ejemplo, un aumento o una disminución en la acidificación extracelular, en la respuesta de las células expuestas al polipéptido del Zcyto21, en relación con un control no expuesto al Zcyto21, son una medición directa de las respuestas celulares moduladas por el Zcyto21. Además, dichas respuestas moduladas por el Zcyto21 pueden analizarse bajo diversos estímulos. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para identificar agonistas y antagonistas de las proteínas del Zcyto21, que comprenden proporcionar células que responden a un polipéptido del Zcyto21; cultivar

una primera porción de las células en ausencia de un compuesto de prueba; cultivar una segunda porción de las células en presencia de un compuesto de prueba; y detectar un cambio, por ejemplo, un aumento o una disminución, en una respuesta celular de la segunda porción de las células en comparación con la primera porción de las células. El cambio en la respuesta celular se muestra como un cambio medible en la tasa de acidificación extracelular.

5 Cultivar una tercera porción de las células en presencia de una proteína del Zcyto21 y en ausencia de un compuesto de prueba proporciona un control positivo de las células que responden al Zcyto21 y un control para comparar la actividad agonista de un compuesto de prueba con la del polipéptido del Zcyto21. Los antagonistas del Zcyto21 pueden identificarse exponiendo las células a la proteína del Zcyto21 en presencia y ausencia del compuesto de prueba, mientras que una reducción en la actividad estimulada por el Zcyto21 indica actividad antagonista en el compuesto de prueba.

10 La expresión de polinucleótidos del Zcyto21 en animales proporciona modelos para estudiar en forma más detallada los efectos biológicos de la sobreproducción o la inhibición de la actividad de las proteínas *in vivo*. Pueden introducirse polinucleótidos que codifican el Zcyto21 y polinucleótidos no codificantes en animales de prueba, como ratones, utilizando vectores virales o ADN desnudo, o pueden producirse animales transgénicos.

Un enfoque *in vivo* para analizar las proteínas de la presente invención utiliza sistemas de entrega virales. Los ejemplos de virus para este fin incluyen el adenovirus, virus herpes, retrovirus, virus vaccinia y virus adenoasociado (adeno-associated virus, AAV). El adenovirus, un virus de ADN bicatenario, es actualmente el vector de transferencia génica mejor estudiado para la entrega de ácidos nucleicos heterólogos. Para consultar una revisión, véanse Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161-89, 1994; y Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4:44-53, 1997. El sistema del adenovirus ofrece varias ventajas. El adenovirus puede (i) aceptar insertos de ADN relativamente grandes; (ii) ser cultivado hasta alcanzar títulos altos; (iii) infectar una amplia gama de tipos celulares de mamíferos; y (iv) ser utilizado con muchos promotores diferentes, incluidos los promotores ubicuos, los específicos para determinados tejidos y los regulables. Dado que los adenovirus son estables en el torrente sanguíneo, pueden administrarse mediante inyección intravenosa.

Al eliminar partes del genoma del adenovirus, se pueden aceptar insertos mayores (hasta 7 kb) de ADN heterólogo. Estos insertos se pueden incorporar en el ADN viral por ligadura directa o por recombinación homóloga con un plásmido cotransfectado. En un sistema ejemplificativo, se elimina el gen E1 esencial del vector viral, y el virus no se replicará a menos que el gen E1 sea provisto por la célula huésped (p. ej., la línea celular humana 293). Cuando se lo administra por vía intravenosa a animales intactos, el adenovirus se dirige principalmente al hígado. Si el sistema de aplicación adenoviral tiene una eliminación del gen E1, el virus no puede replicarse en las células huésped. No obstante, el tejido del huésped (p. ej., hígado) expresará y procesará (y, si hay una secuencia señal presente, segregará) la proteína heteróloga. Las proteínas segregadas entran a la circulación en el hígado muy vascularizado, y pueden determinarse los efectos en el animal infectado.

Un método alternativo de entrega génica comprende extraer células del cuerpo e introducir un vector en las células como un plásmido de ADN desnudo. Luego, las células transformadas se implantan nuevamente en el cuerpo. Los vectores de ADN desnudo se introducen en las células huésped mediante métodos conocidos en la especialidad, entre los que se incluyen la transfección, la electroporación, la microinyección, la transducción, la fusión celular, el DEAE dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, el uso de una pistola génica o el uso de un transportador de vectores de ADN. Véanse, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624, 1988; Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:963-967, 1992; y Johnston y Tang, *Meth. Cell Biol.* 43:353-365, 1994.

También pueden generarse ratones transgénicos, genomanipulados para expresar un gen Zcyto21, y ratones que exhiben una ausencia completa de la función del gen Zcyto21, denominados ratones genomanipulados o "knockout" (Snouwaert *et al.*, *Science* 257:1083, 1992) (Lowell *et al.*, *Nature* 366:740-742, 1993). Estos ratones pueden utilizarse para estudiar el gen Zcyto21, y la proteína codificada por este, en un sistema *in vivo*. Los ratones transgénicos son particularmente útiles para la investigación de la función de las proteínas del Zcyto21 en el desarrollo temprano, en relación con el hecho de que permiten la identificación de las anomalías o los bloqueos en el desarrollo provocados por la sobreexpresión o la subexpresión de un factor específico. Véanse también, Maisonpierre *et al.*, *Science* 277:55-60, 1997; y Hanahan, *Science* 277:48-50, 1997. Los promotores preferidos para la expresión transgénica incluyen los promotores de genes de la metalotioneína y la albúmina.

Se ha asociado una pérdida del control inhibitorio normal de la contracción muscular con el daño o la perturbación de neuronas secretoras de ácido gamma-aminobutírico seleccionadas. Por ejemplo, el Síndrome del hombre rígido exhibe una rigidez marcada de la musculatura, que se cree está mediada por la interferencia del funcionamiento de sus neuronas productoras de ácido gamma-aminobutírico (gamma-aminobutyric acid, GABA). Otros trastornos neuromusculares relacionados incluyen: miotonía, miopatías metabólicas, síndrome de Isaac, distonía y espasmos tetánicos (Valledeoriola, *J. Neurol* 246:423-431, 1999).

De manera similar, la medición directa del polipéptido del Zcyto21, o su pérdida de expresión en un tejido, pueden determinarse en un tejido o células mientras sufren la progresión tumoral. Los aumentos de la invasión y motilidad de las células, o el aumento o la pérdida de la expresión del Zcyto21 en una condición precancerosa o cancerosa, en comparación con el tejido normal, pueden servir como diagnóstico de la transformación, invasión y metástasis en la progresión tumoral. Como tal, el conocimiento del estadio de progresión o metástasis de un tumor ayudará al médico a elegir el tratamiento más apropiado, o la intensidad del tratamiento, para un paciente con cáncer en parti-

cular. Los métodos para medir el aumento y la pérdida de expresión (del ARNm o la proteína) son bien conocidos en la especialidad y se describen en la presente, y pueden aplicarse a la expresión del Zcyto21. Por ejemplo, la aparición o desaparición de polipéptidos que regulan la motilidad celular pueden utilizarse para contribuir al diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (Banyard, J. y Zetter, B.R., *Cancer and Metast. Rev.* 17:449-458, 1999). Como efector de la motilidad celular, o como marcador específico hepático, el aumento o la pérdida de expresión del Zcyto21 puede contribuir al diagnóstico del cáncer de cerebro y otros tipos de cáncer. Además, los análogos al antígeno prostático específico (prostate specific antigen, PSA), el aumento de los niveles de polipéptidos del Zcyto21, o los anticuerpos contra el Zcyto21 en un paciente, en relación con un control normal, pueden indicar la presencia de cáncer de cerebro y otros tipos de cáncer (véase, p. ej., Mulders, TMT, *et al.*, *Eur. J. Surgical Oncol.* 16:37-41, 1990). La fuerte expresión del Zcyto21 en un tejido que normalmente no expresa el Zcyto21 servirá como diagnóstico de una anomalía en el tipo de célula o tejido, o de la invasión o metástasis de tejido hepático canceroso en un tejido no hepático, y podría ayudar al médico a dirigir la realización de más pruebas o investigaciones, o a dirigir el tratamiento.

Asimismo, las sondas de polinucleótidos del Zcyto21, los anticuerpos contra el Zcyto21 y la detección de la presencia de polipéptidos del Zcyto21 en el tejido pueden utilizarse para evaluar si el cerebro u otro tejido que normalmente expresa el Zcyto21 está presente, por ejemplo, después de una cirugía que implica la escisión de un tejido hepático o neuronal enfermo o canceroso. Como tales, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse como ayuda para determinar si se ha escindido todo el tejido después de una cirugía, por ejemplo, después de una cirugía de cáncer de cerebro y otro tipo de cáncer. En estas circunstancias, es especialmente importante extirpar todo el tejido posiblemente enfermo para maximizar la recuperación del paciente con cáncer y para minimizar la recurrencia. Las aplicaciones preferidas incluyen anticuerpos contra el Zcyto21 y elementos de unión a polipéptidos del Zcyto21 fluorescentes, marcados radiactivamente o marcados calorimétricamente, que pueden utilizarse histológicamente o *in situ*.

Además, la actividad y el efecto del Zcyto21 en la progresión tumoral y la metástasis pueden medirse *in vivo*. Se han desarrollado varios modelos de ratones singénicos para estudiar la influencia de los polipéptidos, compuestos u otros tratamientos en la progresión tumoral. En estos modelos, células tumorales desarrolladas por pasaje en cultivo se implantan en ratones de la misma cepa que el donante del tumor. Las células se convertirán en tumores con características similares en el ratón receptor, y también se producirá metástasis en algunos modelos. Los modelos tumorales apropiados para nuestros estudios incluyen el carcinoma pulmonar de Lewis (ATCC N.º CRL-1642) y el melanoma B16 (ATCC N.º CRL-6323), entre otros. Estos dos modelos son líneas tumorales que se utilizan habitualmente, singénicas respecto del ratón C57BL6, que se cultivan y manipulan fácilmente *in vitro*. Los tumores resultantes de la implantación de cualquiera de estas líneas celulares pueden hacer metástasis al pulmón en los ratones C57BL6. El modelo de carcinoma pulmonar de Lewis se ha utilizado recientemente en ratones para identificar un inhibidor de la angiogénesis (O'Reilly MS, *et al. Cell* 79: 315-328, 1994). Se tratan ratones C57BL6/J con un agente experimental a través de una inyección diaria de una proteína, un agonista o un antagonista recombinantes, o una inyección por única vez de adenovirus recombinante. Tres días después de este tratamiento, se implantan entre 10^5 y 10^6 células debajo de la piel dorsal. Como alternativa, las células pueden infectarse con el adenovirus recombinante, como por ejemplo, uno que exprese el Zcyto21, antes de la implantación, de forma tal que la proteína se sintetice en el sitio tumoral o intracelularmente, en lugar de sistémicamente. Normalmente, los ratones desarrollan tumores visibles en el término de 5 días. Los tumores se dejan crecer durante un período de hasta 3 semanas, durante el cual pueden alcanzar un tamaño de entre 1.500 y 1.800 mm³ en el grupo que recibe el tratamiento de control. El tamaño del tumor y el peso corporal se monitorean minuciosamente durante todo el experimento. Al momento del sacrificio, el tumor se extirpa y pesa junto con los pulmones y el hígado. Se ha observado que el peso del pulmón se correlaciona bien con la masa tumoral metastásica. Como medida adicional, se contabilizan las metástasis en la superficie del pulmón. El tumor, los pulmones y el hígado resecaos se preparan para el examen histopatológico, la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*, utilizando los métodos conocidos en la especialidad y descritos en la presente. De esta forma, puede evaluarse la influencia del polipéptido expresado en cuestión, p. ej., el Zcyto21, en la capacidad del tumor de reclutar vasculatura y sufrir metástasis. Además, aparte de utilizar adenovirus, las células implantadas pueden transfectarse con Zcyto21 en forma transitoria. El uso de transfectantes estables de Zcyto21, así como el uso de promotores inducibles, para activar la expresión del Zcyto21 *in vivo* son conocidos en la especialidad y pueden utilizarse en este sistema para evaluar la inducción de la metástasis por parte del Zcyto21. Además, pueden inyectarse directamente Zcyto21 purificado o medio acondicionado con Zcyto21 en este modelo de ratón, y así utilizarlo en este sistema. Para uso como referencia general, véanse O'Reilly MS, *et al. Cell* 79:315-328, 1994; y Rusciano D, *et al. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis* 14:349-361, 1995.

Puede utilizarse la metodología no codificante para inhibir la transcripción del gen Zcyto21 a fin de examinar los efectos de dicha inhibición *in vivo*. Se diseñan polinucleótidos complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica el Zcyto21 (p. ej., un polinucleótido como el presentado en la SEC. ID. N.º 1), para que se unan al ARNm que codifica el Zcyto21 y para que inhiban la traducción de dicho ARNm. Estos oligonucleótidos no codificantes también pueden utilizarse para inhibir la expresión de genes que codifican polipéptidos del Zcyto21 en cultivo celular.

La mayoría de las citocinas, así como otras proteínas producidas por los linfocitos activados, desempeñan una función biológica importante en la diferenciación celular, la activación, el reclutamiento y la homeostasis de las células en todo el cuerpo. Se prevé que la actividad del Zcyto21 y de los inhibidores del Zcyto21 tendrá diversas aplicaciones terapéuticas. Estas aplicaciones terapéuticas incluyen el tratamiento de enfermedades que requieren re-

gulación inmunitaria, incluidas enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, el lupus eritematoso sistémico y la diabetes. El Zcyto21 puede ser importante en la regulación de la inflamación y, por lo tanto, puede ser útil en el tratamiento de la artritis reumatoide, el asma y la septicemia. Es posible que el Zcyto21 desempeñe una función en la mediación de la tumorigénesis, mientras que un antagonista del Zcyto21 podría ser de utilidad en el tratamiento del cáncer. Es posible que el Zcyto21 sea de utilidad en la modulación del sistema inmunitario, mientras que el Zcyto21 y los antagonistas del Zcyto21 podrían utilizarse para reducir el rechazo de injertos, prevenir la enfermedad injerto contra huésped, estimular la inmunidad a enfermedades infecciosas, tratar a pacientes inmunocomprometidos (p. ej., pacientes VIH⁺) o mejorar las vacunas.

Como un polipéptido similar al interferón en los tejidos del cerebro, el islote, la próstata, los testículos, la hipófisis, la placenta, el tumor ovárico, el tumor pulmonar, el tumor rectal y el tumor ovárico, así como en una línea celular de CD3⁺, y en una línea celular epitelial prostática infectada por un virus, el Zcyto21 es útil para modular la infección viral, la tumorigénesis y la metástasis en estos y otros tejidos. En dichos casos, la molécula similar al interferón puede ser liberada por la célula en el sitio de infección o de crecimiento celular anormal, o como una molécula segregada, puede migrar al sitio desde un tejido distante.

Las propiedades antivirales del Zcyto21 son particularmente útiles en el tratamiento de la infección por virus del papiloma *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, los tumores provocados por virus del papiloma humano provocan tumores benignos (por ejemplo, verrugas genitales), así como tumores malignos, como carcinomas de células escamosas. El tratamiento para estas condiciones suele ser la cirugía o la destrucción del tejido. No obstante, en la actualidad, se ha demostrado que algunos fármacos antivirales/inmunomoduladores, incluido el interferón alfa, son efectivos en la reducción del tamaño de los tumores. Véase Baker, G.E *et al.*, *Dermatol. Clin. Apr.* 15: 331-340, 1997. Además, como se analiza en Rockley, P.F. *et al.*, (*Pharmacol. Ther.* 65(2): 265-287, 1995), el tratamiento inmunológico con interferones puede dirigirse contra todos los sitios de infección, incluidas la enfermedad clínica, subclínica y latente. En este ejemplo, se han utilizado con éxito el IFN-alfa, el IFN-beta y el IFN-gamma como monoterapia, así como en combinación con otros tratamientos, para tratar el condiloma acuminado anogenital. El Zcyto21 será un tratamiento útil similar al IFN-alfa, al IFN-beta y al IFN-gamma en este tratamiento. Además, ha existido una fuerte asociación entre determinados tipos de virus del papiloma humano y el cáncer de cuello uterino. El Zcyto21 puede utilizarse para detectar, monitorear y tratar el cáncer de cuello uterino.

Como proteína pequeña segregada en las células de los islotes, el Zcyto21 puede modular el crecimiento y la diferenciación de estas células. Asimismo, el Zcyto21 puede ser de utilidad en el tratamiento de la diabetes y condiciones inmunitarias relacionadas con el crecimiento y la diferenciación de las células.

La presencia del Zcyto21 en las células del cerebro y la hipófisis indica que también puede ser de utilidad en el crecimiento y la diferenciación de estas células. Además, las moléculas de la presente invención pueden ser responsables de la homeostasis nutricional, incluidos los trastornos del comportamiento relacionados con la alimentación y la supresión del apetito. Asimismo, las moléculas de Zcyto21 pueden ser de utilidad en el tratamiento de los trastornos de la reproducción en general.

Los polipéptidos del Zcyto21 pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes vasculogénicos o angiogénicos, incluido el VEGF. Al utilizar el Zcyto21 en combinación con un agente adicional, los dos compuestos pueden administrarse en forma simultánea o secuencial, según sea apropiado para la condición específica que se tratará.

El Zcyto21 será de utilidad en el tratamiento de la tumorigénesis y, por lo tanto, será útil en el tratamiento del cáncer. Una inhibición por parte del Zcyto21 de las células B normales estimuladas por anti-IgM y un efecto similar observado en las líneas de tumores de células B sugieren que puede existir un beneficio terapéutico en el tratamiento de pacientes con el Zcyto21 a fin de inducir las células de tumores de células B a un estado menos proliferativo. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes que ya se utilizan, incluidos los agentes quimioterápicos convencionales y los inmunomoduladores como el interferón alfa. Se ha demostrado que los interferones alfa/beta son efectivos en el tratamiento de algunas leucemias y modelos de enfermedad en animales, y los efectos inhibidores del crecimiento del interferón-alfa y el Zcyto21 pueden ser aditivos para las líneas celulares derivadas de tumores de células B.

La presente invención proporciona un método para reducir la proliferación de células B o T neoplásicas, que comprende administrarle a un mamífero con neoplasia de células B o T una cantidad de una composición de Zcyto21 suficiente para reducir la proliferación de las células B o T neoplásicas. La estimulación por parte del Zcyto21 de células NK líticas de progenitoras de la médula y la proliferación de células T después de la activación de los receptores de antígenos mejorará el tratamiento para los pacientes que reciben alotrasplantes de médula y, por lo tanto, el Zcyto21 aumentará la generación de respuestas antitumorales, con o sin la infusión de linfocitos del donante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la proliferación de células B o T neoplásicas, que comprende administrarle a un mamífero con neoplasia de células B o T una cantidad de una composición de antagonista del Zcyto21 suficiente para reducir la proliferación de las células B o T neoplásicas. Además, el antagonista del Zcyto21 puede ser una proteína de fusión ligando/toxina.

Puede utilizarse una toxina de fusión Zcyto21-saporina contra un conjunto similar de leucemias y linfomas, lo que ampliará la gama de leucemias que pueden tratarse con el Zcyto21. La activación del receptor del Zcyto21 mediada por una toxina de fusión proporciona dos formas independientes de inhibir el crecimiento de las células diana: la primera es idéntica a los efectos observados a través del ligando solo, y la segunda se debe a la entrega de la toxina a través de la internalización del receptor.

En función de los conocimientos proporcionados en la presente, las moléculas de Zcyto21 similares al interferón de la presente invención serán de utilidad para detectar, monitorear o tratar diversas condiciones, tales como: tricoleucemia, carcinoma de células renales, carcinoma de células basales, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, linfoma no Hodgkin, papilomatosis laríngea, micosis fungoide, condiloma acuminado, epidermodisplasia verruciforme inducida por el virus del papiloma, hepatitis B crónica, hepatitis C, hepatitis D crónica, y hepatitis no A, no B/C crónica. La Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. ha aprobado el uso del interferón- β para el tratamiento de la esclerosis múltiple, una enfermedad crónica del sistema nervioso. El interferón- γ se utiliza para tratar las enfermedades granulomatosas crónicas, en las que el interferón fortalece la respuesta inmunitaria del paciente para destruir los patógenos bacterianos, fúngicos y protozoarios infecciosos. Los estudios clínicos también indican que el interferón- γ puede ser útil para el tratamiento del SIDA, la leishmaniasis y lepra lepromatosa.

Para uso farmacéutico, las proteínas del Zcyto21 se formulan para administración tópica o parenteral, en particular intravenosa o subcutánea, de acuerdo con los métodos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido del Zcyto21 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como solución salina, solución salina amortiguada, dextrosa al 5% en agua, o similares. Las formulaciones también pueden incluir uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes amortiguadores, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Los métodos de formulación son bien conocidos en la especialidad y se divulgan, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19.a ed., 1995. Preferentemente, el Zcyto21 se utilizará en una concentración de entre aproximadamente 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del volumen total, aunque pueden utilizarse concentraciones dentro del rango de entre 1 ng/ml y 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Para la aplicación tópica, por ejemplo, para promover la cicatrización de heridas, la proteína se aplicará dentro del rango de entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/cm}^2$ del área de la herida; la dosis exacta será determinada por el médico clínico de acuerdo con los estándares aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y severidad de la condición tratada, las características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro de los conocimientos generales de la materia. Las dosis se administran todos los días o en forma intermitente durante el período de tratamiento. La administración intravenosa se realizará mediante inyección o infusión en bolo durante un período típico, que durará entre una y varias horas. También pueden utilizarse formulaciones de liberación prolongada. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva de Zcyto21 es una cantidad suficiente para producir un cambio significativo desde el punto de vista clínico en la condición tratada, como por ejemplo, un cambio significativo desde el punto de vista clínico en la función hematopoyética o inmunitaria, una reducción significativa en la morbilidad o un aumento significativo en el índice histológico.

Las proteínas, los agonistas y los antagonistas del Zcyto21 son de utilidad para la modulación de la expansión, proliferación, activación, diferenciación, migración o el metabolismo de los tipos celulares que responden, que incluyen tanto células primarias como líneas celulares cultivadas. De particular interés en tal sentido son las células hematopoyéticas, las células mesenquimales (incluidas células progenitoras, y células mieloides y linfoides maduras), las células endoteliales, las células epiteliales, las células del músculo liso, los fibroblastos, los hepatocitos, las células neurales y las células progenitoras embrionarias. Para estos tipos celulares, los polipéptidos del Zcyto21 se agregan a un medio de cultivo tisular a una concentración de entre aproximadamente 10 pg/ml y aproximadamente 100 ng/ml . Los especialistas en la materia reconocerán que las proteínas del Zcyto21 pueden combinarse ventajosamente con otros factores de crecimiento en un medio de cultivo.

Dentro del campo de investigación en laboratorio, las proteínas del Zcyto21 también pueden utilizarse como estándares de peso molecular o como reactivos en las valoraciones para determinar los niveles circulantes de la proteína, como por ejemplo, en el diagnóstico de trastornos caracterizados por la sobreproducción o subproducción de la proteína del Zcyto21 o en el análisis del fenotipo celular.

Las proteínas del Zcyto21 también pueden utilizarse para identificar inhibidores de su actividad. Se agregan compuestos de prueba a las valoraciones divulgadas más arriba para identificar los compuestos que inhiben la actividad de la proteína del Zcyto21. Además de las valoraciones divulgadas más arriba, las muestras pueden analizarse en lo concerniente a la inhibición de la actividad del Zcyto21 dentro de diversas valoraciones diseñadas para medir la unión a receptores o la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes del Zcyto21. Por ejemplo, pueden transfectarse líneas celulares que respondan al Zcyto21 con un constructo génico indicador que responde a una vía celular estimulada por el Zcyto21. Los constructos génicos indicadores de este tipo son conocidos en la especialidad, y generalmente comprenderán un elemento de respuesta al suero (serum response element, SRE) activado por el Zcyto21, ligado operablemente a un gen que codifica una proteína que puede someterse a valoraciones, como la luciferasa. Se evalúa la capacidad de los compuestos, soluciones, mezclas o extractos candidatos de inhibir la actividad del Zcyto21 en las células diana según lo evidenciado por una disminución en la estimulación de la expresión del gen indicador por parte del Zcyto21. Las valoraciones de este tipo detectarán compuestos que bloquean directamente la unión del Zcyto21 a receptores de superficie celular, así como compuestos que bloquean procesos en la vía celular posteriores a la unión de ligandos y receptores. Como alternativa, pueden evaluarse

compuestos u otras muestras en lo concerniente al bloqueo directo de la unión del Zcyto21 al receptor utilizando Zcyto21 etiquetado con un marcador detectable (p. ej., ¹²⁵I, biotina, peroxidasa de rábano, FITC y similares). Dentro de las valoraciones de este tipo, la capacidad de una muestra de prueba de inhibir la unión del Zcyto21 marcado al receptor indica una actividad inhibitoria, que puede confirmarse a través de valoraciones secundarias. Los receptores utilizados dentro de las valoraciones de unión pueden ser receptores celulares o receptores inmovilizados aislados.

Tal como se lo usa en la presente, el término “anticuerpos” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígenos de estos, como los fragmentos F(ab')₂ y Fab, anticuerpos de una sola cadena, y similares, incluidos los anticuerpos genomanipulados. Pueden humanizarse anticuerpos no humanos injertando regiones determinantes de complementariedad (complementarity-determining region, CDR) no humanas en regiones marco y constantes humanas, o incorporando la totalidad de los dominios variables no humanos (opcionalmente “rodeándolos” con una superficie similar a la humana mediante el reemplazo de los residuos expuestos, donde el resultado es un anticuerpo “revestido”). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios marco de la región variable humana, a fin de aumentar las características de unión adecuadas. A través de la humanización de los anticuerpos, puede aumentarse la vida media biológica, y se reduce la posibilidad de que se produzcan reacciones inmunitarias adversas en la administración a seres humanos. Un especialista en la materia puede generar anticuerpos humanizados con dominios constantes específicos y diferentes (es decir, subclases de Ig diferentes) para facilitar o inhibir diversas funciones inmunitarias asociadas con dominios constantes de anticuerpos en particular. Se dice que los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido o una proteína del Zcyto21 con una afinidad, al menos, 10 veces mayor que la afinidad de unión al polipéptido o la proteína de control (no Zcyto21). Una persona con conocimientos generales de la materia puede determinar con facilidad la afinidad de un anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

Los métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la especialidad (véase, por ejemplo, Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982, que se incorpora en la presente por referencia). Es de particular interés generar anticuerpos contra los sitios antigénicos hidrófilos que incluyen, por ejemplo, los residuos 155 (Glu) a 160 (Glu); los residuos 51 (Lys) a 56 (Ala); los residuos 50 (Phe) a 55 (Asp); los residuos 140 (Pro) a 145 (Arg); y los residuos 154 (Gln) a 159 (Lys); como se muestra en la SEC. ID. N.º 2. Como será evidente para una persona con conocimientos generales de la materia, pueden generarse anticuerpos policlonales a partir de diversos animales de sangre caliente, como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas. La inmunogenicidad de un polipéptido del Zcyto21 puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, como el alum (hidróxido de aluminio) o el adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de un polipéptido del Zcyto21 o de una porción de este con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una porción de esta. Si la porción del polipéptido es de “tipo hapteno”, dicha porción puede unirse o ligarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (como la hemocianina de lapa californiana (keyhole limpet hemocyanin, KLH), la albúmina de suero bovino (bovine serum albumin, BSA) o el toxoide tetánico) para inmunización.

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a polipéptidos del Zcyto21, y la selección de bibliotecas de exhibición de anticuerpos en fagos o vectores similares (p. ej., a través del uso del polipéptido del Zcyto21 inmovilizado o marcado). Pueden producirse anticuerpos humanos en animales no humanos transgénicos genomanipulados para contener genes de inmunoglobulina humana según lo divulgado en la Publicación de la WIPO WO 98/24893. Se prefiere que los genes de inmunoglobulina endógenos de estos animales estén inactivados o se eliminen, por ejemplo, mediante recombinación homóloga.

Pueden utilizarse diversas valoraciones conocidas para los especialistas en la materia para detectar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos del Zcyto21. Se describen detalladamente ejemplos de valoraciones en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichas valoraciones incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayos, radioinmuno-precipitados, ensayos con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA), ensayos de transferencia puntual, análisis Western blot, valoraciones de inhibición o competencia, y ensayos tipo sándwich.

Los anticuerpos contra el Zcyto21 pueden utilizarse para la purificación por afinidad de la proteína, dentro de valoraciones de diagnóstico para determinar los niveles circulantes de la proteína; para detectar o cuantificar el polipéptido soluble del Zcyto21 como marcador de la patología o enfermedad subyacente; para la inmunolocalización dentro de animales enteros o cortes de tejido, incluidas aplicaciones de inmunodiagnóstico; para inmunohistoquímica; y como antagonista para bloquear la actividad de la proteína *in vitro* e *in vivo*. Los anticuerpos contra el Zcyto21 también pueden utilizarse para etiquetar las células que expresan el Zcyto21; para la purificación por afinidad de los polipéptidos y las proteínas del Zcyto21; en métodos analíticos que emplean FACS; para el cribaje de genotecas de expresión; y para generar anticuerpos antiidiotípicos. Los anticuerpos pueden unirse a otros compuestos, incluidos agentes terapéuticos y de diagnóstico, utilizando métodos conocidos para dirigir dichos compuestos a células que expresen receptores del Zcyto21. Para determinadas aplicaciones, incluidos usos diagnósticos *in vitro* e *in vivo*, es ventajoso utilizar anticuerpos marcados. Los marcadores o etiquetas directos adecuados incluyen: radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores,

inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los marcadores o etiquetas indirectos pueden incluir el uso de biotina-avidina u otros pares de complemento/anticomplemento como intermediarios. Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden utilizarse para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo* (p. ej., inhibición de la proliferación celular). Véase, en general, Ramakrishnan *et al.*, *Cancer Res.* 56:1324-1330, 1996.

Los polipéptidos y las proteínas de la presente invención pueden utilizarse para identificar y aislar receptores. Los receptores del Zcyto21 pueden participar en la regulación del crecimiento en el hígado, la formación de vasos sanguíneos y otros procesos de desarrollo. Por ejemplo, las proteínas y los polipéptidos del Zcyto21 pueden inmovilizarse en una columna, y se hacen pasar preparaciones de membrana por la columna (como se divulga en forma general en *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Hermanson *et al.*, ed., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pág.195-202). Las proteínas y los polipéptidos también pueden marcarse radiactivamente (*Methods Enzymol.*, vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Academic Press, San Diego, 1990, 721-737) o marcarse por fotoafinidad (Brunner *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 62:483-514, 1993 y Fedan *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 33:1167-1180, 1984) y utilizarse para etiquetar proteínas de superficie celular específicas. De manera similar, las proteínas y los polipéptidos del Zcyto21 marcados radiactivamente pueden utilizarse para clonar el receptor cognado en valoraciones de unión utilizando células transfectadas con una genoteca de expresión de ADNc.

Los polipéptidos del Zcyto21 también pueden utilizarse para enseñar técnicas analíticas, tales como: espectrometría de masas; dicroísmo circular para determinar la conformación, especialmente de las cuatro hélices alfa; cristalografía de rayos x para determinar la estructura tridimensional en detalle atómico; y espectroscopia de resonancia magnética nuclear para revelar la estructura de las proteínas en una solución. Por ejemplo, se puede entregar al estudiante un equipo que contenga el Zcyto21 para que lo analice. Dado que el instructor conocerá la secuencia de aminoácidos, se le puede proporcionar la proteína al estudiante como una prueba para determinar sus habilidades o para desarrollar las habilidades del estudiante; de esta forma, el instructor sabrá si el estudiante ha analizado el polipéptido correctamente o no. Dado que cada polipéptido es único, la utilidad educativa del Zcyto21 será única.

Los anticuerpos que se unen específicamente al Zcyto21 pueden utilizarse como ayuda educativa para enseñar a los estudiantes cómo preparar columnas de cromatografía de afinidad para purificar el Zcyto21, clonando y secuenciando el polinucleótido que codifica un anticuerpo y, por ende, como una práctica para enseñarle a un estudiante cómo diseñar anticuerpos humanizados. Por lo tanto, el gen Zcyto21, su polipéptido o su anticuerpo serán envasados por compañías que elaboran reactivos y serán vendidos a instituciones educativas, para que los estudiantes adquieran conocimientos sobre técnicas de biología molecular. Dado que cada gen y proteína es único, cada gen y proteína genera desafíos y experiencias de aprendizaje únicos para los estudiantes en una práctica de laboratorio. Los equipos educativos que contienen el gen Zcyto21, su polipéptido o su anticuerpo se consideran dentro del alcance de la presente invención. La presente invención, descrita de manera general, se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a título ilustrativo y no tienen por objeto constituir una limitación de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se construye mediante recombinación homóloga un plásmido de expresión que contenga la totalidad o parte de un polinucleótido que codifique el Zcyto21. Se aísla un fragmento de ADNc del Zcyto21 mediante PCR utilizando la secuencia de polinucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' que se corresponden con las secuencias del vector que flanquean el punto de inserción del Zcyto21. Cada uno de los cebadores para PCR incluyen, del extremo 5' al 3': 40 pb de secuencia flanqueante del vector y 17 pb que corresponden a los extremos amino y carboxilo terminales del marco de lectura abierto del Zcyto21.

Se pasan 10 μ l de la mezcla de reacción PCR de 100 μ l por un gel de agarosa con una baja temperatura de fusión al 0,8% (SeaPlaque GTG[®]; FMC BioProducts, Rockland, ME) con 1 x solución amortiguadora TBE para su análisis. Los 90 μ l restantes de la mezcla de reacción se precipitan con la adición de 5 μ l de NaCl 1 M y 250 μ l de etanol absoluto. El plásmido pZMP6, que ha sido cortado con SmaI, se utiliza para la recombinación con el fragmento de PCR. El plásmido pZMP6 es un vector de expresión de mamíferos que contiene un casete de expresión que tiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humana; un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcadores seleccionables de mamíferos que comprende un promotor, un potenciador y un origen de replicación del SV40, un gen DHFR y el terminador del SV40; y las secuencias de URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. Fue construido a partir del pZP9 (depositado en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N.º de Acceso 98668) con los elementos genéticos de levaduras tomados del pRS316 (depositado en la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el N.º de Acceso 77145), un elemento de sitio de ingreso de ribosomas interno (internal ribosome entry site, IRES) del virus de la poliomielitis, y el dominio extracelular de la CD8 truncado en el extremo C terminal del dominio transmembrana.

ES 2 286 128 T3

Se combinan independientemente 100 microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 μ l de las diversas mezclas de ADN mencionadas más arriba, y se las transfiere a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las mezclas de levadura/ADN se electropulsan utilizando configuraciones de alimentación eléctrica (BioRad Laboratories, Hercules, CA) de 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohmios, 25 μ F. Se agregan a cada cubeta 600 μ l de sorbitol 1,2 M, se siembra la levadura en dos alícuotas de 300 μ l en dos placas de URA-D y se las incuba a 30°C. Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura⁺ de una sola placa se resuspenden en 1 ml de H₂O y se los centrifuga brevemente para obtener un sedimento de células de levadura. Luego, se resuspende el sedimento celular en 1 ml de solución amortiguadora de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se agregan 500 microlitros de la mezcla de lisis en un tubo Eppendorf que contiene 300 μ l de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 μ l de fenol-cloroforno, se los mezcla en vórtex dos o tres veces en intervalos de 1 minuto, y se los centrifuga durante 5 minutos en una centrifugadora Eppendorf a la velocidad máxima. Se transfieren 300 microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipita el ADN con 600 μ l de etanol (EtOH), seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de ADN se resuspende en 10 μ l de H₂O.

Se realiza la transformación de células huésped de *E. coli* electrocompetentes (células Electromax DH10B™; obtenidas a través de Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) con 0,5-2 ml de preparación de ADN de levadura y 40 μ l de células. Las células se electropulsan a 1,7 kV, 25 μ F y 400 ohmios. Después de la electroporación, se siembran 1 ml de SOC (triptona Bacto™ al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) en alícuotas de 250 μ l en cuatro placas de LB AMP (caldo de LB (Lennox), agar Bacto™ al 1,8% (Difco), 100 mg/L de ampicilina).

Se identifican mediante digestión de restricción los clones individuales que albergan el constructo de expresión correcto para el Zcyto21, a fin de verificar la presencia del inserto de Zcyto21 y confirmar que las diversas secuencias de ADN se hayan unido entre sí en forma correcta. Se realiza el análisis de la secuencia de los insertos de clones positivos. El ADN plasmídico en mayor escala se aísla utilizando un equipo disponible comercialmente (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El constructo correcto se designa pZMP6/Zcyto21.

Ejemplo 2

Se siembran células CHO DG44 (Chasin *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-666, 1986) en placas de cultivo tisular de 10 cm y se las deja crecer hasta una confluencia de aproximadamente entre un 50% y un 70% de un día para el otro a 37°C, con 5% de CO₂, en medio F12/FBS de Ham (medio F12 de Ham (Life Technologies), suero bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina al 1% (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato de sodio al 1% (Life Technologies)). Luego, se transfectan las células con el plásmido Zcyto21/pZMP6 mediante transfección mediada por liposomas utilizando una formulación liposomal 3:1 (p/p) del lípido policationico 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminocarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propaniminio-trifluoroacetato y el lípido neutro dioleoil fosfatidiletanolamina en agua filtrada con membrana (reactivo Lipofectamine™, Life Technologies), en formulación de medio sin suero (serum free, SF) (F12 de Ham, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuína, L-glutamina al 1% y piruvato de sodio al 1%). Se diluye el Zcyto21/pZMP6 en tubos de 15 ml hasta alcanzar un volumen final total de 640 μ l con medio SF. Se mezclan 35 μ l de Lipofectamine™ con 605 μ l de medio SF. La mezcla resultante se agrega a la mezcla de ADN, y se la deja incubar durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 5 ml de medio SF a la mezcla de ADN:Lipofectamine™. Las células se enjuagan una vez con 5 ml de medio SF, se las aspira y se las agrega a la mezcla de ADN:Lipofectamine™. Las células se incuban a 37°C durante cinco horas, y luego se agregan a cada placa 6,4 ml de F12 de Ham/FBS al 10%, medio de PSN al 1%. Las placas se incuban a 37°C de un día para el otro, y la mezcla de ADN:Lipofectamine™ se reemplaza por un medio nuevo de FBS al 5%/Ham al día siguiente. El día 3 después de la transfección, las células se dividen en matraces T-175 en medio de crecimiento. El día 7 después de la transfección, las células se tiñen con anticuerpo monoclonal FITC anti-CD8 (PharMingen, San Diego, CA), seguido de perlas magnéticas conjugadas con anti-FITC (Miltenyi Biotec). Las células CD8 positivas se separan utilizando columnas disponibles comercialmente (minicolumnas MACS; Miltenyi Biotec) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se las coloca en DMEM/F12 de Ham/FBS al 5% sin nucleósidos pero con metotrexato 50 nM (medio de selección).

Las células se siembran para la subclonación a una densidad de 0,5; 1 y 5 células por pocillo, en placas de 96 pocillos en medio de selección, y se las deja crecer durante aproximadamente dos semanas. Se controla que no se produzca evaporación del medio en los pocillos y se restablece el nivel de 200 μ l por pocillo según sea necesario durante este proceso. Cuando un gran porcentaje de las colonias de la placa está cerca de la confluencia, se recolectan 100 μ l del medio de cada pocillo para su análisis mediante transferencia puntual, y se aplica medio de selección nuevo a las células. El sobrenadante se coloca en un filtro de nitrocelulosa en un aparato de transferencia puntual, y el filtro se trata a 100°C en un horno de vacío para desnaturalizar la proteína. El filtro se incuba en Tris-glicina 625 mM, pH 9,1, β -mercaptoetanol 5 mM, a 65°C, 10 minutos, y luego en solución amortiguadora Western A (gelatina al 0,25%, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal CA-630 al 0,05%) con leche desnatada en polvo al 2,5%, de un día para el otro, a 4°C, en un agitador giratorio. El filtro se incuba con el conjugado de anticuerpo-HRP en solución amortiguadora Western A con leche desnatada en polvo al 2,5%, durante 1 hora, a temperatura ambiente, en un agitador giratorio. Luego, el filtro se lava tres veces a temperatura ambiente en PBS más Tween 20 al 0,01%, 15 minutos por lavado. El filtro se revela con reactivos de quimiolu-

ES 2 286 128 T3

miniscencia (equipo de marcado directo ECLTM; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y luego se lo expone a una película (Hyperfilm ECL, Amersham Corp.) durante aproximadamente 5 minutos. Los clones positivos se tripsinizan de la placa de 96 pocillos y se transfieren a placas de 6 pocillos en medio de selección para hacerlo crecer en gran escala y realizar el análisis mediante el método Western blot.

Ejemplo 3

La proteína del Zcyto21 de longitud completa se produce en células BHK transfectadas con el pZMP6/Zcyto21 (Ejemplo 1). Se siembran células BHK 570 (ATCC CRL-10314) en placas de cultivo tisular de 10 cm y se las deja crecer hasta alcanzar aproximadamente una confluencia de entre un 50 y un 70%, de un día para el otro, a 37°C, con 5% de CO₂, en medio de DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL High Glucose; Life Technologies), suero bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato de sodio 1 mM (Life Technologies). Luego, las células se transfectan con pZMP6/Zcyto21 mediante transfección mediada por liposomas (utilizando LipofectamineTM; Life Technologies), en medio sin suero (SF) (DMEM suplementado con 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuína, L-glutamina al 1% y piruvato de sodio al 1%). El plásmido se diluye en tubos de 15 ml hasta alcanzar un volumen final total de 640 µl con medio SF. Se mezclan 35 µl de la mezcla de lípidos con 605 µl de medio SF, y se deja incubar la mezcla resultante durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregan 5 mililitros de medio SF a la mezcla de ADN:lípidos. Las células se enjuagan una vez con 5 ml de medio SF, se las aspira y se agrega la mezcla de ADN:lípidos. Las células se incuban a 37°C durante cinco horas, y luego se agregan a cada placa 6,4 ml de DMEM/FBS al 10%, medio de PSN al 1%. Las placas se incuban a 37°C de un día para el otro, y la mezcla de ADN:lípidos se reemplaza por un medio nuevo de FBS al 5%/DMEM al día siguiente. El día 5 después de la transfección, las células se dividen en matraces T-162 en medio de selección (DMEM + FBS al 5%, L-Gln al 1%, NaPyr al 1%, metotrexato 1 µM). Aproximadamente 10 días después de la transfección, se tripsinizan dos placas de cultivo de 150 mm de colonias resistentes al metotrexato de cada transfección, y las células se agrupan y siembran en un matraz T-162 y se transfieren a un cultivo en gran escala.

Ejemplo 4

Para la construcción de vectores de adenovirus, se amplifica la región codificante de la proteína del Zcyto21 humana mediante PCR utilizando cebadores que agregan sitios de restricción de PmeI y AscI en los terminales 5' y 3', respectivamente. La amplificación se realiza con una plantilla de ADNc del Zcyto21 de longitud completa en una reacción PCR, de la siguiente manera: un ciclo a 95°C durante 5 minutos; seguido de 15 ciclos a 95°C durante 1 min, 61°C durante 1 min, y 72°C durante 1,5 min; seguidos de 72°C durante 7 min; seguido de un remojo a 4°C. El producto de la reacción PCR se carga en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1,2% en solución amortiguadora TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). El producto de la PCR del Zcyto21 se extrae del gel y se purifica utilizando un equipo disponible comercialmente que comprende una columna de centrifugado con membrana de gel de sílice (equipo de purificación de PCR y equipo de limpieza con gel QIAquick[®]; Qiagen, Inc.) según las instrucciones del equipo. Luego, el producto de la PCR se digiere con PmeI y AscI, se extrae con fenol/cloroformo, se precipita con EtOH y se rehidrata en 20 ml de TE (Tris/EDTA, pH 8). A continuación, el fragmento del Zcyto21 se liga en los sitios de PmeI-AscI del vector transgénico pTG12-8 y se transforma en células competentes DH10BTM de *E. coli* mediante electroporación. El vector pTG12-8 se derivó del p2999B4 (Palmiter *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 13:5266-5275, 1993) mediante la inserción de un intrón de insulina II de rata (ca. 200 pb) y un poliligador (Fse I/Pme I/Asc I) en el sitio de Nru I. El vector comprende una región no traducida de promotor de metalotioneína (MT-1) de ratón (ca. 750 pb) y hormona de crecimiento humana (hGH) y una señal de poliadenilación (ca. 650 pb) flanqueada por 10 kb de la secuencia flanqueante MT-1 5' y 7 kb de la secuencia flanqueante MT-1 3'. El ADNc se inserta entre las secuencia de insulina II y hGH. Los clones que contienen el Zcyto21 se identifican mediante una minipreparación de ADN plasmídico, seguida por la digestión con PmeI y AscI. Se secuencia un clon positivo para garantizar que no se hayan producido eliminaciones ni otras anomalías en el constructo.

Se prepara ADN utilizando un equipo disponible comercialmente (Maxi Kit, Qiagen, Inc.), y el ADNc del Zcyto21 se libera del vector pTG12-8 utilizando enzimas PmeI y AscI. El ADNc se aísla en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1% y se extrae del gel. El corte de gel se funde a 70 µC, y el ADN se extrae dos veces con un volumen igual de fenol amortiguado con Tris, se precipita con EtOH y se resuspende en 10 µl de H₂O.

El ADNc del Zcyto21 se clona en los sitios de EcoRV-AscI de un pAdTrack-CMV modificado (He, T-C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2509-2514, 1998). Este constructo contiene el gen marcador de proteína fluorescente verde (green fluorescent protein, GFP). El promotor del CMV que provoca la expresión de la GFP se reemplaza por el promotor del SV40, y la señal de poliadenilación del SV40 se reemplaza por la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana. Además, el poliligador original se reemplaza por sitios de FseI, EcoRV y AscI. Esta forma modificada de pAdTrack-CMV se denomina pZyTrack. La ligadura se realiza utilizando un equipo de ligadura y cribaje de ADN disponible comercialmente (equipo Fast-Link[®]; Epicentre Technologies, Madison, WI). Los clones que contienen el Zcyto21 se identifican mediante la digestión de una minipreparación de ADN con FseI y AscI. A fin de linealizar el plásmido, se digieren con PmeI aproximadamente 5 µg del plásmido del Zcyto21 pZyTrack resultante. Aproximadamente 1 µg del plásmido linealizado se cotransforma con 200 ng de pAdEasy superenrolla-

ES 2 286 128 T3

do (He *et al.*, *ibid.*) en células de *E. coli* BJ5183 (He *et al.*, *ibid.*). La cotransformación se realiza utilizando un pulsador génico Bio-Rad a 2,5 kV, 200 ohmios y 25 μ Fa. Toda la mezcla de la cotransformación se siembra en 4 placas con LB que contienen 25 μ g/ml de kanamicina. Se escogen las colonias más pequeñas, se las expande en LB/kanamicina, y se identifica el ADN del adenovirus recombinante mediante procedimientos de minipreparación de ADN estándar. El ADN del adenovirus recombinante de la minipreparación se transforma en células competentes DH10B™ de *E. coli* y el ADN se prepara utilizando un Maxi Kit (Qiagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del equipo.

Aproximadamente 5 μ g de ADN adenoviral recombinante se digieren con la enzima PacI (New England Biolabs) durante 3 horas, a 37°C, en un volumen de reacción de 100 μ l que contiene 20-30 U de PacI. El ADN digerido se extrae dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo y se precipita con etanol. El sedimento de ADN se resuspende en 10 μ l de agua destilada. Se transfecta un matraz T25 de células QBI-293A (Quantum Biotechnologies, Inc. Montreal, Qc. Canadá) inoculadas el día anterior y cultivadas hasta un 60 a 70% de confluencia, con el ADN digerido por la PacI. El ADN digerido por la PacI se diluye hasta un volumen total de 50 μ l con HBS estéril (NaCl 150 mM, HEPES 20 mM). En un tubo por separado, se diluyen 20 μ l de 1 mg/ml de sales de N-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) hasta un volumen total de 100 μ l con HBS. Se agrega el ADN al DOTAP, se lo mezcla suavemente pipeteando hacia arriba y abajo, y se lo deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se retira el medio de las células 293A y se lo lava con 5 ml de medio esencial mínimo (minimum essential medium, MEM) alfa sin suero que contiene piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM, y solución amortiguadora HEPES 25 mM (los reactivos se obtienen a través de Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se agregan 5 ml de MEM sin suero a las células 293A y se lo mantiene a 37°C. La mezcla se ADN/lípidos se agrega en gotas al matraz T25 de células 293A, se la mezcla suavemente y se la incuba a 37°C durante 4 horas. Después de 4 horas, el medio que contiene la mezcla de ADN/lípidos se aspira y se reemplaza por 5 ml de MEM completo que contiene suero bovino fetal al 5%. Se monitorea la expresión de GFP y la formación de focos (placas virales) en las células transfectadas.

Siete días después de la transfección de las células 293A con el ADN adenoviral recombinante, las células expresan la proteína GFP y comienzan a formar focos (“placas” virales). Se recolecta el lisado viral crudo utilizando un raspador de células para recolectar todas las células 293A. Se transfiere el lisado a un tubo cónico de 50 ml. Para liberar la mayoría de las partículas de virus de las células, se efectúan tres ciclos de congelamiento/descongelamiento en un baño de hielo seco/etanol y un baño María a 37°C.

El lisado crudo se amplifica (amplificación primaria (1.º)) para obtener un “lote” de trabajo de lisado rAdV del Zcyto21. Se preparan 20 horas antes 10 placas de 10 cm de células 293A casi confluentes (80-90%), se agregan 200 ml de lisado rAdV crudo a cada placa de 10 cm y se monitorea el efecto citopático (cytopathic effect, CPE) de las células durante un período de entre 48 y 72 horas bajo el microscopio de luz blanca, y la expresión de GFP bajo el microscopio fluorescente. Cuando todas las células 293A muestran CPE, se recolecta el lisado de este lote y se efectúan los ciclos de congelamiento/descongelamiento descritos más arriba.

Luego, se realiza una amplificación secundaria (2.º) del rAdV del Zcyto21. Se preparan 20 placas de 15 cm de cultivo tisular de células 293A, de forma tal que las células tengan una confluencia de entre un 80 y un 90%. Se retira todo el medio MEM al 5%, excepto 20 ml, y se inocula cada placa con entre 300 y 500 ml del lisado de rAdV con amplificación 1.º. Después de 48 horas, se lisan las células 293A de la producción de virus, se recolecta el lisado en frascos de centrifugado de polipropileno de 250 ml y se purifica el rAdV.

Se agrega detergente NP-40 a los frascos de lisado crudo hasta alcanzar una concentración final de 0,5%, a fin de lisar todas las células. Los frascos se colocan en una plataforma giratoria durante 10 minutos agitando lo más rápido posible, sin que los frascos se caigan. Los restos se sedimentan mediante centrifugación a 20.000 X G durante 15 minutos. El sobrenadante se transfiere a frascos de centrifugado de policarbonato de 250 ml, y se agrega un volumen de 0,5 de solución de PEG8000 al 20%/NaCl 2,5 M. Los frascos se agitan en hielo de un día para el otro. Los frascos se centrifugan a 20.000 X G durante 15 minutos, y el sobrenadante se descarta en una solución de blanqueador. Utilizando un raspador de células estéril, se resuspende el precipitado blanco de virus/PEG de 2 frascos en 2,5 ml de PBS. La solución de virus resultante se coloca en tubos de microcentrifugado de 2 ml y se la centrifuga a 14.000 X G en la microcentrifugadora durante 10 minutos, a fin de retirar cualquier resto adicional de células. El sobrenadante de los tubos de microcentrifugado de 2 ml se transfiere a un tubo de polipropileno de 15 ml con tapa a presión, y se lo ajusta a una densidad de 1,34 g/ml con CsCl. La solución se transfiere a tubos de centrifugado de policarbonato de 3,2 ml con paredes gruesas, y se la centrifuga a 348.000 X G durante entre 3 y 4 horas a 25 μ C. El virus forma una banda blanca. La banda de virus se recolecta utilizando puntas para pipetas de diámetro ancho.

Se utiliza una columna de intercambio iónico disponible comercialmente (p. ej., columnas PD-10 prearmadas con Sephadex® G-25M; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) para desalinizar la preparación de virus. La columna se equilibra con 20 ml de PBS. Se carga el virus y se lo deja pasar por la columna. Se agregan 5 ml de PBS a la columna, y se recolectan fracciones de entre 8 y 10 gotas. Se determinan las densidades ópticas de diluciones 1:50 de cada fracción a 260 nm en un espectrofotómetro. Se agrupan las fracciones pico, y se determina la densidad óptica (optical density, OD) de una dilución 1:25. Se convierte la OD a concentración viral utilizando la fórmula:

$$(OD \text{ a } 260 \text{ nm})(25)(1,1 \times 10^{12}) = \text{viriones/ml.}$$

ES 2 286 128 T3

Para almacenar el virus, se agrega glicerol al virus purificado hasta alcanzar una concentración final del 15%, se lo mezcla suave pero efectivamente, y se lo almacena en alícuotas a $-80\ \mu\text{C}$.

Se sigue un protocolo desarrollado por Quantum Biotechnologies, Inc. (Montreal, Canadá) para medir la infectividad del virus recombinante. En resumen, se siembran en dos placas de cultivo tisular de 96 pocillos 1×10^4 células 293A por pocillo en MEM que contiene suero bovino fetal al 2% para cada virus recombinante analizado. Después de 24 horas, se realizan diluciones de 10 veces de cada virus de 1×10^{-2} a 1×10^{-14} en MEM que contiene suero bovino fetal al 2%. Se colocan $100\ \mu\text{l}$ de cada dilución en cada uno de los 20 pocillos. Después de 5 días a 37°C , se leen los pocillos positivos o negativos para el CPE, y se calcula un valor de “unidades de formación de placas/ml” (Plaque Forming Units, PFU).

Ejemplo 5

Se producen animales transgénicos que expresan genes Zcyto21 utilizando machos adultos fértiles (sementales) (B6C3f1, de 2 a 8 meses de edad, (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (castrados) (CD1, de 2 a 8 meses, (Taconic Farms)), hembras fértiles prepúberes (donantes) (B6C3f1, de 4 a 5 semanas, (Taconic Farms)) y hembras adultas fértiles (receptoras) (CD1, de 2 a 4 meses, (Taconic Farms)).

Las donantes se aclimatan durante 1 semana y luego son inyectadas con aproximadamente 8 UI/ratón de gonadotropina sérica de yegua preñada (Sigma, St. Louis, MO) I.P. y, entre 46 y 47 horas más tarde, con 8 UI/ratón de gonadotropina coriónica humana (hCG (Sigma)) I.P. para inducir la superovulación. Las donantes son apareadas con los sementales con posterioridad a las inyecciones de hormonas. En general, la ovulación se produce dentro de las 13 horas posteriores a la inyección de hCG. La copulación se confirma por la presencia de un tapón vaginal a la mañana siguiente del apareamiento.

Los óvulos fertilizados se recogen bajo microscopio quirúrgico (Leica MZ12 Stereo Microscope, Leica, Wetzlar, DE). Se recogen los oviductos y los óvulos se depositan en portaobjetos para análisis de orina que contienen hialuronidasa (Sigma). Se lavan los óvulos una vez en hialuronidasa y dos veces en medio W640 de Whitten (Tabla 4) que ha sido incubado con 5% de CO_2 , 5% de O_2 y 90% de N_2 a 37°C . Luego, se almacenan los óvulos en una incubadora a 37°C con 5% de CO_2 hasta la microinyección.

Se linealizan entre 10 y 20 microgramos de ADN plasmídico que contiene un ADNc del gen Zcyto21, se los purifica en gel, y se los resuspende en Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,25 mM (pH 8,0), hasta alcanzar una concentración final de entre 5 y 10 nanogramos por microlitro para microinyección.

Se microinyecta el ADN plasmídico en los óvulos cosechados contenidos en una gota de medio W640 cubierta con aceite mineral equilibrado con CO_2 tibio. Luego, se extrae el ADN en una aguja para inyección (retirada de un tubo capilar de vidrio de borosilicato de 0,75 mm de D.I. y 1 mm de D.E.) y se lo inyecta en los óvulos individuales. Se penetra cada óvulo con la aguja para inyección, llegando a uno o ambos pronúcleos haploides.

Se inyectan picolitros de ADN en los pronúcleos, y se retira la aguja para inyección sin entrar en contacto con los nucléolos. Se repite el procedimiento hasta que todos los óvulos hayan sido inyectados. Los óvulos correctamente microinyectados se transfieren a una placa de cultivo de tejido orgánico con medio W640 previamente gasificado, para su almacenamiento de un día para otro en una incubadora a 37°C con 5% de CO_2 .

Al día siguiente se transfieren a la receptora entre 12 y 17 embriones sanos de 2 células de la inyección del día anterior. Se localiza la ampolla hinchada y se sostiene el oviducto entre la ampolla y la bolsa, para realizar un pequeño corte en el oviducto con una aguja de 28 g cerca de la bolsa, con cuidado para no desgarrar la ampolla ni la bolsa. Los embriones se implantan a través de este corte, y sujetando la pared peritoneal, los órganos reproductores se guían nuevamente hacia la cavidad abdominal.

Las receptoras son devueltas a sus jaulas en pares y se deja que transcurran entre 19 y 21 días de gestación. Después del nacimiento, se deja que transcurran entre 19 y 21 días de período posparto antes del destete. Se determina el sexo de las crías y se las coloca en jaulas separadas por sexos. Se les corta una muestra para biopsia de 0,5 cm de la cola (que se utiliza para genotipificación) con unas tijeras limpias.

Se prepara el ADN genómico a partir de los trozos de cola usando un equipo Dneasy de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se analiza con PCR utilizando cebadores diseñados para la porción 3' UTR de la hormona de crecimiento humana (hGH) del vector transgénico. Se identificó una región exclusiva de la secuencia humana a partir de un alineamiento de las secuencias 3' UTR del ADN de la hormona de crecimiento humana y murina, asegurando que la reacción PCR no amplificara la secuencia murina. A menudo se utilizan cebadores que amplifican un fragmento de la hGH de 368 pares de bases y cebadores que se hibridan con secuencias de los vectores y amplifican el inserto de ADNc junto con los cebadores de hGH. En estos experimentos, el ADN de animales positivos para el transgen generará dos bandas, una banda de 368 pares de bases que corresponde al fragmento 3' UTR de la hGH y una banda de tamaño variable que corresponde al inserto de ADNc.

ES 2 286 128 T3

Una vez que se confirma que los animales son transgénicos (TG), se realiza la retrocruza con una cepa endogámica colocando una hembra TG con un macho genéticamente intacto, o un macho TG con una o dos hembras genéticamente intactas. A medida que las crías nacen y son destetadas, se las separa por sexos y se les corta la cola para genotipificación.

El análisis del nivel de expresión de ARNm de cada transgen se realiza mediante una valoración de hibridación de solución de ARN o mediante PCR en tiempo real en un equipo ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

TABLA 5

	<u>mg/200 m</u>	<u>mg/500/ml</u>
NaCl	1.280	3.200
KCl	72	180
KH ₂ PO ₄	32	80
MgSO ₄ •7H ₂ O	60	150
Glucosa	200	500
Lactato de Ca ²⁺	106	265
Pen K	15	37,5
Estreptomocina SO ₄	10	25
NaHCO ₃	380	950
Piruvato de Na	5	12,5
H ₂ O	200	500
EDTA	100 µl	250 µl
R rojo fenol al 5%	200 µl	500 µl
BSA	600	1.500

Todos los reactivos pueden obtenerse a través de Sigma.

Ejemplo 6

1. Estimulación de la expresión a partir de un promotor que responde al interferón

En una serie de experimentos, se genera medio acondicionado (conditioned medium, CM) que contiene la proteína del Zcyto21 infectando células 293A con adenovirus recombinante que contiene el ADNc para el Zcyto21 (AdZy-Zcyto21) a una multiplicidad de infección de 400 partículas por célula. Se recoge el CM en los puntos en el tiempo entre 40 horas después de la infección y se lo almacena a -20°C. El CM también se genera a partir de una infección con un adenovirus recombinante que carece de ADNc (AdZy-parental). Antes de usarlo, se concentra una porción del CM 14 veces en un filtro centrífugo Millipore Ultrafree-15 (límite nominal de peso molecular: 5.000) y luego se filtra a través de un filtro centrífugo Millipore Ultrafree-15 (límite nominal de peso molecular: 100.000) para reducir la cantidad de partículas virales presentes en el medio y, finalmente, se filtra a través de un filtro de jeringa Millipore de 0,2 µm para esterilizar el CM. Se diluyen muestras de CM concentrado en una proporción de 1:2 en la solución amortiguadora de unión y se las incuban con células de una línea celular murina durante 5 horas a 37°C.

2. Actividad antiviral del Zcyto21

Otra serie de experimentos examina la actividad antiviral del Zcyto21. En estos estudios, la valoración antiviral se realiza sembrando células L929 (ATCC N.º CCL-1) en medio de crecimiento compuesto por medio RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal al 10%, penicilina, estreptomycin y L-glutamina en un formato de 96 pocillos a razón de 50.000 células por pocillo. Se incubó CM de adenovirus de células 293A infectado con AdZy-Zcyto21m o AdZy-parental, según se describió más arriba, con las células de un día para otro. El interferón- α murino diluido en serie 1:10, partiendo de 100 ng/ml proporciona un control positivo en la valoración. Las células L929 con medio de crecimiento solo proporcionan el control negativo. Las células tratadas se incuban durante 24 horas. Los medios se descartan, se agrega medio fresco y se introduce el virus de la encefalomiocarditis (ATCC N.º vr129b) a una multiplicidad de infección de 0,1 (*es decir*, una partícula de virus por cada diez células L929). Las células se incubaron en presencia del virus durante 24 horas y luego, los pocillos se puntuaron en relación con el efecto citopático porcentual (CPE).

3. Valoración de antiproliferación con una línea celular BAF3

La línea BaF3 se utiliza para determinar si el Zcyto21 tiene propiedades antiproliferativas. Se realiza la transfección estable de células de riñón de hámster lactante (baby hamster kidney, BHK) con un vector de expresión que contiene el promotor del CMV más el intrón A en dirección contraria al ADNc del Zcyto21 o un ADNc no relacionado, denominado Z α 30, utilizando lipofectamina BRL. Las células transfectadas en forma estable se siembran en una fábrica celular en medio sin suero y se las deja crecer durante tres días antes de recoger el medio condicionado y concentrarlo en un filtro 5K hasta 10x. Las muestras de medio acondicionado concentrado se almacenan a 4°C.

Se utiliza la siguiente valoración para analizar la antiproliferación de la línea BaF3. En una placa de 96 pocillos, se realizan ocho diluciones seriadas 1:2 del medio de crecimiento solo (RPMI 1640, fetal suero bovino fetal al 10%, piruvato de sodio 1 mM, L-glutamina 2 mM), o IL-3 murina (comenzando a 50 pg/ml en medio de crecimiento), con un volumen final de 100 μ l. Se agregan cincuenta microlitros de lo siguiente al medio de crecimiento solo o a las hileras diluidas de mL-3: interferón- α humano (100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml diluidos en medio de crecimiento), interferón- β humano (100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml diluidos en medio de crecimiento), interferón- α murino (100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml diluidos en medio de crecimiento), interferón- β murino (100 ng/ml, 10 ng/ml o 1 ng/ml diluidos en medio de crecimiento), Zcyto21 (a 2,5x, 0,5x o 0,1x) y Z α 30 murino (a 2,5x, 0,5x o 0,1x).

La línea celular BaF3 se lava tres veces en medio de crecimiento, se resuspenden los sedimentos en medio de crecimiento, se cuentan las células y se diluyen en medio de crecimiento a 5.000 células/50 μ l. Luego, se agregan cincuenta microlitros de células diluidas a cada dilución de las muestras. Las placas para valoración se incuban en una incubadora a 37°C durante tres a cuatro días. Luego, se agregan veinte microlitros de azul Alamar a cada pocillo y se incuban las placas de un día para el otro a 37°C. Las placas se leen en la lectora de placas fluorescente a la longitud de onda de excitación de 544 y a la longitud de onda de emisión de 590.

Ejemplo 7

Distribución tisular del Zcyto21 humano en paneles de tejido mediante PCR

Se cribó un panel de muestras de ADNc proveniente de tejidos humanos para detectar la expresión del Zcyto21 mediante PCR. El panel se elaboró en forma interna y contenía 77 muestras de ADNc obtenidas por el método Marathon y ADNc de diversos tejidos humanos normales y cancerosos así como de diversas líneas celulares, como se muestra en la Tabla 6 más abajo. Las muestras de ADNc provenían de genotecas propias o preparaciones de ADNc por el método Marathon de ARN realizadas internamente o de un proveedor comercial, por ejemplo, Clontech (Palo Alto, CA) o Invitrogen (Carlsbad, CA). Los ADNc obtenidos por el método Marathon se elaboraron utilizando un equipo de amplificación de ADNc Marathon (Marathon cDNA Amplification Kit, Clontech). Para asegurar la calidad de las muestras del panel, se realizaron tres pruebas de control de calidad (quality control, QC): (1) para evaluar la calidad del ARN utilizado para las genotecas, los ADNc propios se probaron para determinar el tamaño promedio de los insertos mediante PCR con oligos de vectores que eran específicos para las secuencias de vectores para una genoteca de ADNc individual; (2) la estandarización de la concentración del ADNc en las muestras del panel se logró mediante métodos de PCR estándar para amplificar el ADNc de G3PDH o de la tubulina alfa de longitud completa; y (3) se envió una muestra para secuenciamiento a fin de detectar una posible contaminación con ADN ribosomal o mitocondrial. Se preparó el panel en un formato de 96 pocillos que incluía una muestra de control positivo de ADN genómico humano (Clontech). Cada pocillo contenía aproximadamente 0,2-100 pg/ μ l de ADNc. Las primeras reacciones PCR se establecieron utilizando los oligos ZC39,270 (SEC. ID. N.º 14) y ZC39,272 (SEC. ID. N.º 15), mezcla de ADN polimerasa Advantage 2 (Advantage 2 DNA Polymerase Mix, Clontech) y colorante Rediload (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). La amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94° durante 1 minuto; luego, 35 ciclos de 94°, 10 segundos; 67°, 45 segundos y terminó con una extensión final de 3 minutos a 72°. Se observó el tamaño correcto de fragmento de ADN en cerebro, islote, próstata, testículo, hipófisis, placenta, tumor ovárico, tumor pulmonar, CD3+ y HPV. Se preparó otra reacción PCR utilizando

ES 2 286 128 T3

los oligos ZC39,270 (SEC. ID. N.º 14) y ZC39,271 (SEC. ID. N.º 16), mezcla de ADN polimerasa Advantage 2 (Clontech) y colorante Rediload (Research Genetics). La amplificación se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°, 1 minuto; luego, 35 ciclos de 94°, 10 segundos; 65°, 30 segundos; 72°, 30 segundos y terminó con una extensión de 3 minutos a 72°. Se observó el tamaño de fragmento de ADN correcto en hipófisis, tumor rectal y tumor ovárico.

TABLA 6

Tejido	Cant. de muestras evaluadas	Tejido	Cant. de muestras evaluadas
glándula suprarrenal	1	vejiga	1
médula ósea	3	cerebro	2
cuello uterino	1	colon	1
cerebro fetal	3	corazón fetal	2
riñón fetal	1	hígado fetal	2
pulmón fetal	1	piel fetal	1
corazón	2	músculo fetal	1
riñón	2	hígado	1
pulmón	1	ganglio linfático	1
glándula mamaria	1	melanoma	1
ovario	1	páncreas	1
hipófisis	2	placenta	3
próstata	3	recto	1
glándula salival	2	músculo esquelético	1
intestino delgado	1	médula espinal	2
bazo	1	útero	1
estómago	1	biblioteca de adipocitos	1

ES 2 286 128 T3

	testículos	5	islote	1
5	timo	1	células del músculo liso de la próstata	1
10	tiroides	2	RPMI 1788 (ATCC N.º CCL-156)	1
	tráquea	1	WI38 (ATCC N.º CCL-75)	1
15	tumor esofágico	1	tumor pulmonar	1
	tumor hepático	1	tumor ovárico	1
20	tumor rectal	1	tumor de estómago	1
25	tumor uterino	2	Células mononucleares de sangre periférica seleccionadas de la biblioteca de CD3+ (estimuladas)	1
30	Biblioteca de HaCAT	1	Biblioteca de HPV (ATCC N.º CRL-2221)	1
35	Biblioteca de HPVS (ATCC N.º CRL-2221) - seleccionada	1	Biblioteca de MG63	1
40	K562 (ATCC N.º CCL-243)	1		

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.
- 5 2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, donde el polipéptido además comprende una secuencia señal de secreción.
3. El polipéptido aislado de la reivindicación 2, donde la secuencia señal de secreción comprende los residuos de aminoácidos 1 a 19 de la SEC. ID. N.º 2.
- 10 4. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 90% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2, donde el polipéptido aislado tiene actividad antiviral.
- 15 5. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde la secuencia de aminoácidos es, al menos, un 95% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.
6. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido tiene actividad antiviral contra el virus de la hepatitis.
- 20 7. El polipéptido aislado de la reivindicación 6, donde el polipéptido tiene actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B.
- 25 8. El polipéptido aislado de la reivindicación 6, donde el polipéptido tiene actividad antiviral contra el virus de la hepatitis C.
9. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido es un polipéptido recombinante.
- 30 10. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido se aísla a partir de una célula procariota generada en forma recombinante, que alberga un ácido nucleico heterólogo recombinante que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 4.
11. El polipéptido aislado de la reivindicación 10, donde el polipéptido se aísla a partir de *Escherichia coli*.
- 35 12. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido se aísla a partir de una célula eucariota.
13. El polipéptido aislado de la reivindicación 12, donde el polipéptido se aísla a partir de una célula de mamífero.
- 40 14. El polipéptido aislado de la reivindicación 13, donde el polipéptido se aísla a partir de células de ovario de hámster chino.
15. El polipéptido aislado de la reivindicación 4, donde el polipéptido también comprende polietilenglicol.
- 45 16. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15.
17. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido, donde el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 90% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2, y donde el polipéptido codificado tiene actividad antiviral.
- 50 18. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 17, donde cualquier diferencia entre el polipéptido codificado y los correspondientes residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 se debe a una sustitución conservadora de aminoácidos.
- 55 19. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 17, donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende los nucleótidos 58 a 603 de la SEC. ID. N.º 1.
20. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 17, donde la molécula de ácido nucleico aislada comprende los nucleótidos 1 a 603 de la SEC. ID. N.º 1.
- 60 21. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos ligados operablemente:
- 65 un promotor de la transcripción;
- la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17; y
- un terminador de la transcripción.

ES 2 286 128 T3

22. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde el polipéptido codificado comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 95% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.

5 23. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde el polipéptido codificado comprende los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.

24. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde el polipéptido codificado comprende los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.

10 25. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde la molécula de ácido nucleico comprende los nucleótidos 58 a 603 de la SEC. ID. N.º 1.

15 26. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde la molécula de ácido nucleico también codifica una secuencia señal de secreción ligada operablemente al polipéptido.

27. El vector de expresión de la reivindicación 21, donde la secuencia señal de secreción codificada comprende los residuos de aminoácidos 1 a 19 de la SEC. ID. N.º 2.

20 28. Una célula huésped recombinante aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 21, donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en bacteria, célula de levadura, célula fúngica, célula de insecto, célula de mamífero y célula de origen vegetal.

25 29. Un método *in vitro* para producir un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es, al menos, un 90% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2; y que comprende el paso de:

cultivar células huésped recombinantes que comprenden un vector de expresión de la reivindicación 21 y que producen el polipéptido;

30 donde el polipéptido tiene actividad antiviral.

35 30. El método para producir un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 29, donde la secuencia de aminoácidos es, al menos, un 95% idéntica a los residuos de aminoácidos 20 a 200 de la SEC. ID. N.º 2 o los residuos de aminoácidos 1 a 200 de la SEC. ID. N.º 2.

31. El método de la reivindicación 29, que también comprende el paso de aislar el polipéptido de las células huésped recombinantes cultivadas.

40 32. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 4.

33. Una formulación farmacéutica que comprende:

el polipéptido aislado de la reivindicación 4 o la reivindicación 5; y

45 un vehículo farmacéuticamente aceptable.

34. La formulación de la reivindicación 33, donde el polipéptido también comprende polietilenglicol.

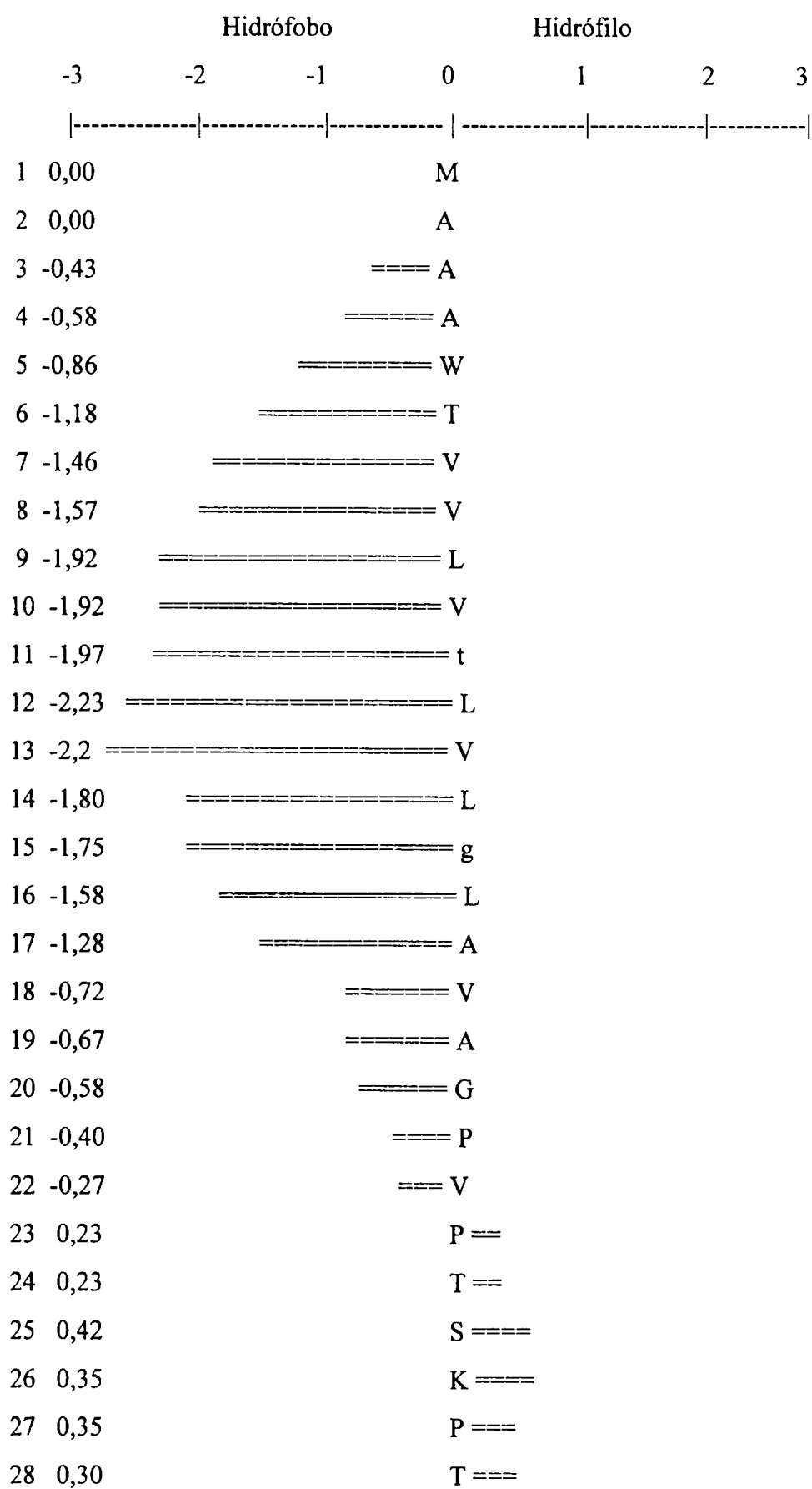
50

55

60

65

ES 2 286 128 T3



ES 2 286 128 T3

29	0,30	T===
30	0,30	T===
31	0,20	G==
32	0,18	K==
33	-0,05	G
34	-0,05	C
35	-0,05	H

ES 2 286 128 T3

36	-0,47	===== I
37	0,20	G ==
38	0,33	R ===
39	0,33	F ===
40	0,38	K =====
41	-0,12	= S
42	0,33	L ===
43	0,33	S ===
44	-0,02	P
45	0,20	Q ==
46	0,20	E ==
47	-0,22	= L
48	0,25	A ===
49	0,25	S ===
50	0,47	F =====
51	1,05	K =====
52	1,50	K =====
53	1,83	A =====
54	1,03	R =====
55	1,03	D =====
56	1,62	A =====
57	1,17	L =====
58	0,37	E ===
59	0,95	E =====
60	0,95	S =====
61	0,95	L =====
62	0,48	K =====
63	0,27	L ===
64	0,62	K =====
65	-0,05	= N
66	0,30	w ===

ES 2 286 128 T3

67 -0,15	== S
68 -0,18	== C
69 -0,27	=== S
70 -0,73	===== S
71 -0,57	===== P
72 -0,62	===== V
73 -0,63	===== F

ES 2 286 128 T3

74	-0,80	===== P
75	-0,05	= G
76	0,07	N =
77	0,57	w =====
78	0,27	D ===
79	-0,07	= L
80	0,13	R =
81	-0,62	===== L
82	0,18	L ==
83	0,18	Q ==
84	0,98	V =====
85	1,28	R =====
86	1,00	E =====
87	1,17	R =====
88	0,37	P ===
89	0,37	V =====
90	-0,22	== A
91	0,28	L ===
92	0,23	E ==
93	0,23	A ==
94	0,23	E ==
95	-0,33	== L
96	-0,55	===== A
97	-0,55	===== L
98	-0,50	===== T
99	-0,72	===== L
100	0,08	K =
101	0,07	V =
102	0,28	L ===
103	-0,30	== E
104	-0,05	A

ES 2 286 128 T3

105	0,25	A ===
106	-0,33	=== A
107	-0,55	===== G
108	0,03	P
109	0,62	A =====
110	0,37	L ===
111	0,07	E =

ES 2 286 128 T3

112	0,65	D=====
113	0,98	V=====
114	0,48	L=====
115	-0,32	=== D
116	-0,15	= Q
117	0,08	P =
118	-0,72	===== L
119	-0,83	===== H
120	-0,92	===== T
121	-0,92	===== L
122	-1,13	===== H
123	-1,02	===== H
124	-0,68	===== I
125	-0,90	===== L
126	-0,78	===== S
127	-0,57	===== Q
128	-0,43	===== L
129	-0,78	===== Q
130	-0,78	===== A
131	-0,48	===== C
132	-0,48	===== I
133	-0,40	===== Q
134	-0,30	===== P
135	-0,08	= Q
136	-0,12	= P
137	-0,12	= T
138	0,35	A =====
139	0,35	G =====
140	0,92	P =====
141	1,00	R =====
142	1,50	P =====

ES 2 286 128 T3

143	1,20	R	=====
144	0,62	G	=====
145	0,53	R	=====
146	-0,53		===== L
147	-0,83		===== H
148	-1,42		===== H
149	-0,62		===== W

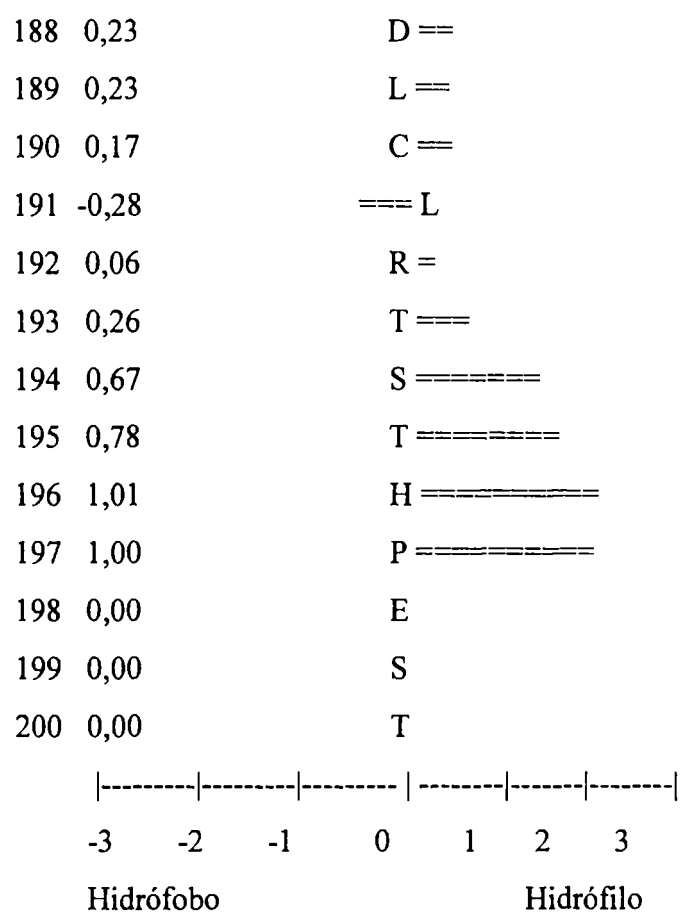
ES 2 286 128 T3

150	-0,83	===== L
151	-0,72	===== H
152	0,35	R=====
153	0,57	L=====
154	0,65	Q=====
155	0,65	E=====
156	1,45	A=====
157	1,92	P=====
158	1,47	K=====
159	1,47	K=====
160	0,90	E=====
161	0,23	S==
162	-0,57	===== A
163	-0,57	===== g
164	-0,70	===== C
165	-0,57	===== L
166	-0,25	==== E
167	-0,15	= A
168	-0,27	==== S
169	-0,73	===== V
170	-0,95	===== T
171	-1,42	===== F
172	-0,67	===== N
173	-0,90	===== L
174	-0,78	===== F
175	-0,88	===== R
176	-0,08	= L
177	0,83	L=====
178	0,03	T
179	0,83	R=====
180	0,75	D=====

ES 2 286 128 T3

181	0,57	L =====
182	-0,02	K
183	-0,02	Y
184	0,28	V ==
185	0,28	A ==
186	0,37	D =====
187	0,45	G =====

ES 2 286 128 T3



FIGURA

ES 2 286 128 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ZymoGenetics, Inc.
- 5 <120> PROTEÍNA DEL ZCYTO21 SIMILAR AL INTERFERÓN
- <130> 01-18PC
- 10 <140> EP 06012489.8
<141> 2001-06-29
- 15 <150> 60/285.424
<151> 2001-04-20
- <150> 60/215.446
20 <151> 2000-06-30
- <160> 16
- 25 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- <210> 1
<211> 603
<212> ADN
30 <213> *Homo sapiens*
- <220>
35 <221> CDS
<222> (1)...(603)
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 286 128 T3

<400> 1

atg gct gca gct tgg acc gtg gtg ctg gtg act ttg gtg cta ggc ttg 48

5 Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

10

gcc gtg gca ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag 96

Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys

15

20 25 30

20

ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg 144

Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala

25

35 40 45

30

agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa 192

Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys

35

50 55 60

40

aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg 240

Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg

45

65 70 75 80

50

ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc 288

Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala

85 90 95

55

ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac 336

Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp

60

100 105 110

65

gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag etc 384

Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu

ES 2 286 128 T3

115 120 125

5 cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc 432

Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly

10 130 135 140

15 cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag 480

Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu

20 145 150 155 160

25 tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc 528

Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu

165 170 175

30 ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg gac ctg tgt ctg aga 576

Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg

35 180 185 190

40 acg tca acc cac cct gag tcc acc tga 603

Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr

195 200

45 <210> 2

<211> 200

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

55 Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

60

65

ES 2 286 128 T3

Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys
 20 25 30
 5 Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala
 35 40 45
 10 Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys
 50 55 60
 15 Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 20 Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala
 85 90 95
 25 Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp
 100 105 110
 30 Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu
 115 120 125
 35 Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly
 130 135 140
 40 Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
 145 150 155 160
 45 Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
 165 170 175
 50 Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg
 180 185 190
 Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
 195 200

<210> 3

<211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia degenerada

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(600)

<223> n = A,T,C o G

ES 2 286 128 T3

<400> 3

atggcngcng cntggacngt ngtnyngtn acnyngtny tnggnyngc ngngcnggn 60
5 ccngtncna cnwsnaarcc nacnacnacn ggnaarggnt gycayathgg nmgnttyaar 120
wsnytnwsnc encargaryt ngenwsnity aaraargcnm gngaygnynt ngargarwsn 180
10 ytnaarytna araaytgows ngywsnwsn ccngtnttyc cnggnaaytg ggayytmgm 240
ytntncarg tnmngarmg nccngtngcn yngargcng aryngcnynt nacnytnaar 300
15 gtntngarg cngcngcngg nccngcnytn gargaygtny tngaycarcc nytncaaycn 360
ytncaycaya thytwnsna rytncargcn tgyathcarc encarcnac ngcnggnccn 420
mgnccnmng gnmgnytnc ycaytggytn caymgnytn argargcnc naaraargar 480
20 wsngcnggnt gyytngargc nwsngtnacn tyaaytnt tymgnyntyt nacnmngay 540
ytnaartayg tngcngaygg ngayytntgy ytnmgnacnw snacncaycc ngarwsnacn 600

25 <210> 4

<211> 603

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

35 <222> (1)...(603)

<400> 4

40 atg gct gca gct tgg acc gtg gtg ctg gtg act ttg gtg cta ggc ttg 48

45

50

55

60

65

ES 2 286 128 T3

Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

5

gcc gtg gca ggc cct gtc ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag 96

10

Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys

20 25 30

15

ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg 144

Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala

20

35 40 45

25

agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa 192

Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys

30

50 55 60

35

aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg 240

Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg

65 70 75 80

40

ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc 288

Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala

45

85 90 95

50

ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac 336

Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp

55

100 105 110

60

gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc 384

Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu

65

115 120 125

ES 2 286 128 T3

cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc 432

Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly

5 130 135 140

cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag 480

Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu

10 145 150 155 160

tcc get ggc tgc ctg gag gca tct gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc 528

Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu

15 165 170 175

ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc gat ggg aac ctg tgt ctg aga 576

Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg

20 180 185 190

acg tca acc cac cct gag tcc acc tga 603

Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr

25 195 200

<210> 5

<211> 200

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

35 Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu

1 5 10 15

40 Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys

20 25 30

45

50

ES 2 286 128 T3

Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala

35 40 45

5

Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys

50 55 60

10

Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg

65 70 75 80

15

Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala

85 90 95

Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp

20

100 105 110

Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu

25

115 120 125

Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly

130 135 140

30

Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu

145 150 155 160

35

Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu

165 170 175

40

Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg

180 185 190

Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr

45

195 200

<210> 6

50

<211> 856

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55

<220>

<221> CDS

<222> (98)...(700)

60

65

ES 2 286 128 T3

<400> 6

aattaccttt tcactttaca cacatcatct tggattgccc atttgctgtg gctaaaaagc 60

5 agagccatgc cgctggggaa gcagttgcca tttagcc atg gct gca gct tgg acc 115

Met Ala Ala Ala Trp Thr

1 5

10

gtg gtg ctg gtg act ttg gtg cta ggc ttg gcc gtg gca ggc cct gtc 163

15 Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val

10 15 20

20

ccc act tcc aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg 211

25 Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg

25 30 35

30

ttc aaa tct ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg 259

35 Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg

40 45 50

40

gac gcc ttg gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct 307

Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser

55 60 65 70

45

cct gtc ttc ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag 355

50 Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu

75 80 85

55

cgc cct gtg gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg 403

60 Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu

90 95 100

65

ES 2 286 128 T3

gag gcc gct gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt 451

Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu

5 105 110 115

cac acc ctg cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct 499

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro

15 120 125 130

cag ccc aca gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg 547

Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu

20 135 140 145 150

cac cgg ctc cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag 595

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu

30 155 160 165

gca tet gtc acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa 643

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys

40 170 175 180

tat gtg gcc gat ggg aac ctg tgt ctg aga acg tca acc cac cct gag 691

Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu

50 185 190 195

tcc acc tga cacccacac cttattatg cgctgagccc tactcctcc 740

Ser Thr

55 200

ttaatttatt tcctctcacc cttatttat gaagctgcag ccttgactga gacatagggc 800

tgagtttatt gtttacttt tatacattat gcacaaataa acaacaagga attgga 856

65 <210> 7
<211> 200

ES 2 286 128 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 7

Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys
 20 25 30
 Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala
 35 40 45
 Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys
 50 55 60
 Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg
 65 70 75 80
 Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala
 85 90 95
 Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp
 100 105 110
 Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu
 115 120 125
 Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly
 130 135 140
 Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu
 145 150 155 160
 Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu
 165 170 175
 Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg
 180 185 190
 Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
 195 200

<210> 8

<211> 676

65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 286 128 T3

<220>

<221> CDS

<222> (17)...(676)

5

<400> 8

gccctcggcc aattgg atg gtg ccc acc aca ttg gca gag cca tgc cgc tgg 52

10

Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Glu Pro Cys Arg Trp

1 5 10

15

gga agc agt tgc gat tta gcc atg gct gca gct tgg acc gtg gtg ctg 100

20

Gly Ser Ser Cys Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu

15 20 25

25

gtg act ttg gtg cta ggc ttg gcc gtg gca ggc cct gtc ccc act tcc 148

Val Thr Leu Val Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser

30

30 35 40

35

aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct 196

Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser

45 50 55 60

40

ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg 244

45

Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu

50

55

60

65

ES 2 286 128 T3

65 70 75

5 gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc 292
 Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe

10 80 85 90

15 ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg 340
 Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val

20 95 100 105

25 gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct 388
 Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala

30 110 115 120

35 gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg 436
 Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu

40 125 130 135 140

45 cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca 484
 His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr

50 145 150 155

55 gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac egg ctc 532
 Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu

60 160 165 170

65 cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc 580
 Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val

175 180 185

acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc 628

ES 2 286 128 T3

Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala

190 195 200

5

gat ggg gac ctg tgt ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc acc tga 676

10

Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr

205 210 215

15 <210> 9

<211> 219

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

25

Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Glu Pro Cys Arg Trp Gly Ser Ser Cys

1 5 10 15

30

Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val

20 25 30

35

Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr

35 40 45

40

Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln

50 55 60

45

Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu

65 70 75 80

50

Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp

85 90 95

55

Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala

100 105 110

60

Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala

115 120 125

65

ES 2 286 128 T3

5 Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu
 130 135 140
 Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg
 145 150 155 160
 10 Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro
 165 170 175
 15 Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu
 180 185 190
 20 Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu
 195 200 205
 Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
 25 210 215

<210> 10
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> secuencia degenerada
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(660)
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 10

atggtncna cnacnyngc ngarccntgy mgntggggnw snwsntgyga yytngcnatg 60
 50 gcngcngcnt ggacngtngt nytngtnacn ytngtnytng gnytngcngt ngcnggnccn 120
 gtncnacnw snaarccnac nacnacnggn aargngtgyc ayathggngmg ntyaarwsn 180
 55 ytnwsncnc argaryngc nwsnttyaar aargcnmgng aygcnytnga rgarwsnytn 240

60

65

ES 2 286 128 T3

aarytnaara aytggwsntg ywsnwsnccn gnttlyccng gnaaytgga yytnmgnytn 300
 ytncaargtnm gngarmgncc ngtnngcnytn gargcngary tngcnytnac nytnaargtn 360
 5 ytnngargcng cngcnggncc ngcnytnngar gaygtnytnng aycarcenytn ncayacnytn 420
 caycayathy tnwsncaryt ncargentgy athearccnc arccnaecngc nggnccnmgn 480
 10 ccnmngnggnm gnytncaayca ytggytncaay mgnytncaarg argcncnaa raargarwsn 540
 gcnggntgyy tngargcnws ngtnacntty aayytntym gnytnytnac nmgngayytn 600
 15 aartaygtng cngayggnga yytnngyytn mgnacnwsna cncayccnga rwsnacntrr 660

<210> 11

<211> 628

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <221> CDS

<222> (17)...(628)

<400> 11

30

gccctcggcc aattgg atg gtg ccc acc aca ttg gct tgg acc gtg gtg ctg 52

Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Trp Thr Val Val Leu

35

1 5 10

40

gtg act ttg gtg cta ggc ttg gcc gtg gca ggc cct gtc ccc act tcc 100

Val Thr Leu Val Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser

45

15 20 25

50

aag ccc acc aca act ggg aag ggc tgc cac att ggc agg ttc aaa tct 148

Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser

55

30 35 40

60

ctg tca cca cag gag cta gcg agc ttc aag aag gcc agg gac gcc ttg 196

65

ES 2 286 128 T3

Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu
 45 50 55 60

5

gaa gag tca ctc aag ctg aaa aac tgg agt tgc agc tct cct gtc ttc 244

10

Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe
 65 70 75

15

ccc ggg aat tgg gac ctg agg ctt ctc cag gtg agg gag cgc cct gtg 292

20

Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val
 80 85 90

25

gcc ttg gag gct gag ctg gcc ctg acg ctg aag gtc ctg gag gcc gct 340

30

Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala
 95 100 105

35

gct ggc cca gcc ctg gag gac gtc cta gac cag ccc ctt cac acc ctg 388

Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu
 110 115 120

40

cac cac atc ctc tcc cag ctc cag gcc tgt atc cag cct cag ccc aca 436

45

His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr
 125 130 135 140

50

gca ggg ccc agg ccc cgg ggc cgc ctc cac cac tgg ctg cac cgg ctc 484

Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu
 145 150 155

55

cag gag gcc ccc aaa aag gag tcc gct ggc tgc ctg gag gca tct gtc 532

60

Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val
 160 165 170

65

ES 2 286 128 T3

acc ttc aac ctc ttc cgc ctc ctc acg cga gac ctc aaa tat gtg gcc 580

Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala

5 175 180 185

gat ggg gac ctg tgt ctg aga acg tca acc cac cct gag tcc acc tga 628

Asp Gly Asp Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr

15 190 195 200

<210> 12

<211> 203

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

25

Met Val Pro Thr Thr Leu Ala Trp Thr Val Val Leu Val Thr Leu Val

1 5 10 15

30

Leu Gly Leu Ala Val Ala Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr

20 25 30

35

Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln

35 40 45

40

Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu

50 55 60

Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp

45

65 70 75 80

Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala

50

85 90 95

Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala

55

100 105 110

Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu

60

115 120 125

65

ES 2 286 128 T3

Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg
 130 135 140
 5 Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro
 145 150 155 160
 10 Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu
 165 170 175
 15 Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asp Leu
 180 185 190
 20 Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
 195 200

<210> 13
 25 <211> 612
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> secuencia degenerada
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (1)...(612)
 <223> n = A,T,C o G
 40 <400> 13

atggtncna cnacnyngc ntggacngtn gtntyngtna cnytngtnyt nggnytnngcn 60
 45 gtngcnggnc cngtncnac nwsnaarccn acnacnacng gnaarggntg ycayathggn 120
 mgnttyaarw snytnwsncc ncargarytn gcnwsnttya araargcnmg ngaygcnytn 180
 50 gargarwsny tnaarytnaa raaytggswn tgywsnwsnc cngtnttycc nggnaaytgg 240
 gayytnmgny tnytncargt nmngngarmgn ccngtngcny tngargcnga rytngcnytn 300
 acnytnaarg tnytngargc ngcngcnggn ccngenytnng argaygtnyt ngaycarccn 360
 55 ytncayacny tncaycayat hytnwsncar ytncargent gyathcarcc ncarccnaen 420
 gcnggncnm gncnmgngg nmgnytnca caytggytnc aymgnytnca rgargcncn 480
 60 aaraargarw sngcnggntg yytnargcn wsngtnacnt tyaaytntt ymgnytnytn 540
 acnmnggayy tnaartaygt ngcngayggn gayytnngyy tnmgnacnws nacncayccn 600
 65 garwsnacnt rr 612

ES 2 286 128 T3

<210> 14
<211> 23
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido ZC39270
10
<400> 14

aggcgggaaga ggttgaaggt gac 23

15
<210> 15
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido ZC39272
25
<400> 15

cgctcctagac cagccccttc ac 22

30
<210> 16
<211> 22
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido ZC39271
40
<400> 16

gaccgtggtg ctggtgactt tg 22

45

50

55

60

65