



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 024**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01127361 .2**
86 Fecha de presentación : **23.07.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **1243597**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54 Título: **Receptores para interleuquina-12 humana.**

30 Prioridad: **01.08.1995 US 1701 P**
30.05.1996 US 18674 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Gubler, Ulrich Andreas y**
Presky, David Howard

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Receptores para interleuquina-12 humana.

Esta solicitud se refiere de forma general a receptores de interleuquina-12, especialmente a receptores de interleuquina-12 humanos.

La interleuquina-12 (IL-12), formalmente conocida como el factor de maduración de linfocitos citotóxicos o el factor estimulante de células asesinas naturales, es una citoquina heterodimérica de 75-kDa compuesta de las subunidades de 40-kDa (p40) y 35-kDa (p35) unidas por disulfuro que tiene múltiples actividades biológicas incluyendo la estimulación de la proliferación de células T activadas y NK (Gately, M. K., *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, **147**:874) (Kobayashi, M., *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.*, **170**:827), la potenciación de la actividad lítica de células NK/LAK (Kobayashi, M., *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.*, **170**:827; Stern, A. S., *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6808), la potenciación de respuestas de células T citolíticas (Gately, M. K., *et al.*, 1992, *Cell. Immunology*, **143**:127), la inducción del interferón γ en reposo y células T y NK activadas (Kobayashi, M. *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.*, **170**:827; Chan, S. H., *et al.*, 1991, *J. Exp. Med.*, **173**:869) y la promoción de respuestas de linfocitos T coadyuvantes del tipo T_H1 (Manetti, R., *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.*, **177**:1199; Hsieh, C.-S., *et al.*, 1993, *Science* **260**:547).

La actividad biológica de IL-12 es mediada por la unión de las moléculas IL-12 a los receptores de la superficie de celular, o membrana celular, en células T y NK activadas; sin embargo, las contribuciones de las subunidades individuales, p35 y p40, a la unión del receptor y a la transducción de la señal son todavía desconocidas. Los estudios con IL-12 marcada han demostrado que esta unión ocurre de una manera específica y saturable. La IL-12 proporciona una señal en las células diana a través de un receptor que ha sido previamente caracterizado en células T CD4+ y CD8+ activadas con fitohemaglutinina (PHA) y en células NK CD56+ activadas con IL-2 (Chizzonite, R., *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3117; Desai, B., *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3125).

En un estudio de más de 20 líneas celulares humanas que pertenecían a líneas T, B, NK y mielomonocíticas sólo se identificó una línea de células T CD4+ humana dependiente de IL-2 individual, (Kit 225/K6) que expresaba constitutivamente al receptor de IL-12 y respondía a IL-12 (Desai, B., *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3125; Desai, B., *et al.*, 1993, *J. Immunol.* **150**:207A). Las células mononucleares de sangre periférica activada con PHA recién preparadas (PBMC) y la línea celular Kit 225/K6 representan así dos fuentes de células convenientes para estudiar la bioquímica del receptor funcional de IL-12; y pueden haber otras.

Con experimentos de unión en equilibrio con IL-12 marcada con I^{125} se identificaron tres sitios con afinidades de unión para IL-12 humana de 5-20 pM, 50-200 pM, y 2-6 nM en células T sensibles a IL-12 (Chizzonite, R., *et al.*, 1994, *Cytokine* **6** (5):A82a).

Un cADN que codifica un receptor de IL-12 de afinidad baja ya ha sido clonado (Chua, A. *et al.*, 1994, *J. Immunology* **153**:128; solicitud de patente europea N°. 0.638.644). Basado en una nomenclatura previamente sugerida (Stahl y Yancopoulos, 1993, *Cell* **74**:587), a la cadena del receptor de IL-12 humano aislado se la llamó inicialmente la cadena de beta1.

La presente solicitud describe proteínas del receptor de IL-12 que comprenden un complejo de la proteína del receptor beta1 con la proteína del receptor de beta2, cuyo complejo es capaz de unirse a la IL-12 humana con alta afinidad. Cuando se expresa en células huésped, el ácido nucleico da lugar a proteínas del receptor de IL-12 sustancialmente homogéneas. La invención se refiere a anticuerpos capaces de unirse a células que expresan las moléculas del receptor de IL-12.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencia de ADN del cADN del receptor beta2 de IL-12 humano. (codon de iniciación = nucleótido 641; codon de terminación = nucleótido 3226.) (SEQ ID NO:1).

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. (restos de aminoácidos con subrayado sencillo en la secuencia del extremo N-terminal = péptido señal; números de aminoácidos 623-646 = zona de transmembrana, marcada por doble subrayado; los 9 sitios potenciales de glicosilación N-unidos en la parte extracelular están marcados por las letras cursivas y también están subrayados; los motivos caja 1 y 2 conservada en el dominio citoplásmico están en sombra [números de restos de aminoácidos 667-669, 699-704, 786-798]) (SEQ ID NO:2).

Figura 3: Secuencia de ADN del cADN del receptor beta1 de IL-12 humano (codon de iniciación = nucleótido 65; codon de terminación = nucleótido 2050) (SEQ ID NO:3).

Figura 4: Secuencia de aminoácidos de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana. (restos de aminoácido subrayados de la secuencia N-terminal = secuencia del péptido señal; restos de aminoácidos números de 541 a 571 = zona de transmembrana marcada por - - - - -; 6 sitios potenciales de glicosilación N-unidos en la parte extracelular marcada por - - - - -; los motivos de caja 1 y 2 conservados en el dominio citoplásmico se marcan por - - - - - [restos de aminoácidos números de 577 a 584 y de 618 a 629]) (SEQ ID NO:4).

Figura 5A: Análisis de Scatchard de la unión de IL-12 recombinante humano a células COS transfectadas que expresan a la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana.

Figura 5B: Análisis de Scatchard de la unión de IL-12 recombinante humano a células COS transfectadas que expresan a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana.

Figura 5C: Análisis de Scatchard de la unión de IL-12 recombinante humano a células COS transfectadas que coexpresan la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana.

Figura 6: Análisis de proliferación, en presencia de varias concentraciones de IL-12 humano, de células Ba/F3 establemente transfectadas con cADN para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana (-- ♦ --), con cADN para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana (-- □ --), o con cADN tanto para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana como para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana (-- • --), midiendo la incorporación de timidina tritiada.

La presente solicitud describe a una proteína del receptor beta2 de interleuquina 12 (IL-12) con baja afinidad de unión, o sus fragmentos, que tiene baja afinidad de unión para IL-12, y que cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de IL-12 forma un complejo que tiene alta afinidad de unión con IL-12. En una realización preferida de la presente invención la proteína del receptor beta2 de IL-12 tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO:2 o que es codificada por un ácido nucleico que es sustancialmente homólogo a SEQ ID NO:1. En una realización más preferida, el ácido nucleico que codifica a la proteína del receptor beta2 de IL-12 es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO:1 o que comparte al menos el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos una homología de secuencia de aproximadamente el 95% con el polipéptido que tiene la SEQ ID NO:1. Especialmente, la solicitud describe a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana que tiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o formas alélicas o sus variantes.

Además, la solicitud de la invención proporciona un complejo capaz de unirse a IL-12 con alta afinidad, que comprende la proteína del receptor beta2 de IL-12, o sus fragmentos, como se define anteriormente complejada con la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, o sus fragmentos, que tiene baja afinidad de unión para IL-12, y cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de IL-12 forma un complejo que tiene alta afinidad de unión con IL-12.

El complejo anterior comprende una proteína del receptor beta1 de IL-12 que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO:4 o que es codificada por un ácido nucleico que es sustancialmente homólogo a SEQ ID NO:3. Además, el ácido nucleico que codifica a la proteína del receptor beta1 de IL-12 es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO:3 o que comparte al menos el 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos una homología de secuencia de aproximadamente el 95% con el polipéptido que tiene la SEQ ID NO:3. Especialmente, la solicitud describe a la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana que tiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o formas alélicas o sus variantes.

La presente solicitud también describe las proteínas anteriores o los complejos que son solubles.

Un aspecto de la presente solicitud es una proteína o un complejo codificado por un ácido nucleico que comprende dos subsecuencias, en el que una de dichas subsecuencias codifica una proteína soluble como se define anteriormente, y la otra de dichas subsecuencias codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig humana distintos que el primer dominio de dicha región constante. La invención también incluye proteínas codificadas por un primero y un segundo ácido nucleico, en el que el primer ácido nucleico comprende dos subsecuencias, en el que una de dichas subsecuencias codifica un fragmento soluble de una proteína del receptor beta2 de IL-12 mencionado anteriormente y la otra de dichas subsecuencias codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig humana distintos que el primer dominio de dicha región constante, y el segundo ácido nucleico comprende dos subsecuencias en el que una de dichas subsecuencias codifica un fragmento soluble de una proteína del receptor beta1 de IL-12 y la otra de dichas subsecuencias codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig humana distintos que el primer dominio de dicha región constante.

La expresión "proteína del receptor beta2 de IL-12 humana" se refiere a (1) la proteína de SEQ ID NO:2, o (2) cualquier proteína o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 y que tiene las propiedades siguientes:

- 1) La proteína o el polipéptido tiene baja afinidad de unión para IL-12 humano, y
- 2) La proteína o el polipéptido, cuando se complejan con la proteína del receptor beta1 humano forman un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12 humano.

La expresión "proteína del receptor beta1 de IL-12 humana" se refiere a (1) la proteína de SEQ ID NO:4, o (2) cualquier proteína o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4 y que tiene las propiedades siguientes:

- 1) La proteína o el polipéptido tienen baja afinidad de unión para IL-12 humano, y

- 2) La proteína o el polipéptido, cuando se complejan con la proteína del receptor beta2 humano forman un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12 humano.

Como se usa en este documento, las expresiones “proteína del receptor beta2 de IL-12” y “proteína del receptor beta1 de IL-12” incluyen proteínas modificadas deliberadamente, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida o por mutaciones aleatorias. Las expresiones también incluyen las variantes que pueden ser preparadas a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o grupos del extremo N- o C-terminal, por medios conocidos en la técnica, y son incluidas en la invención siempre que permanezcan farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína y no confieran propiedades tóxicas en las composiciones que las contienen. Estas variantes pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol que pueden enmascarar sitios antigénicos y ampliar el tiempo de residencia de las proteínas en los fluidos corporales. Otras variantes incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los restos de aminoácido formados con restos de acilo (por ejemplo, grupos alcanofilo o aroflo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de restos serilo o treonilo) formados con restos de acilo.

“Sustancialmente homólogo”, que puede referirse tanto a secuencias de ácidos nucleicos como a aminoácidos, significa que una secuencia objeto particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía de la secuencia de referencia por una o varias sustituciones, deleciones, o adiciones, cuyo efecto neto no causa una desemejanza funcional adversa entre las secuencias de referencia y objeto. Para los objetivos de la presente invención, las secuencias que tienen más que una homología del 80%, más preferible más que del 90% y todavía más preferiblemente más que una homología del 95%, propiedades biológicas equivalentes, y características de expresión equivalentes son consideradas sustancialmente homólogas. Para los objetivos de determinar la homología, el truncamiento de la secuencia madura debería despreciarse. Las secuencias que tienen grados menores de homología, una bioactividad comparable y características de expresión equivalentes son consideradas sustancialmente equivalentes. Generalmente, las secuencias de ADN homólogas pueden ser identificadas por hibridación cruzada bajo condiciones de hibridación de alta severidad.

“Un fragmento de la proteína del receptor beta2 de IL-12” significa cualquier proteína o polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una parte o fragmento de una proteína del receptor beta2 de IL-12, y que (a) tiene baja afinidad de unión para IL-12, y (2) cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de IL-12, forma un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12.

“Un fragmento de la proteína del receptor beta1 de IL-12” significa cualquier proteína o polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una parte o fragmento de la proteína del receptor beta1 de IL-12, y que cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de IL-12, forma un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12.

Un “fragmento soluble” se refiere a un fragmento de una proteína del receptor de IL-12 que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a todo o parte de la región extracelular de la proteína y que conserva la actividad de unión de IL-12 de la proteína del receptor de IL-12 intacta. Por ejemplo, un fragmento soluble de una proteína del receptor beta2 de IL-12 es un fragmento de una proteína del receptor beta2 de IL-12 que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a todo o parte de la región extracelular de una proteína del receptor beta2 de IL-12 humana.

Conforme a la invención, un “complejo” que comprende a la proteína del receptor beta2 de IL-12, o sus fragmentos, complejoado con la proteína del receptor beta1 de IL-12, o sus fragmentos, puede ser expresado sobre la superficie celular de la célula huésped. Cuando se expresa sobre la superficie celular de la célula huésped, el complejo tiene una alta afinidad de unión para IL-12, mientras que la proteína del receptor beta1 de IL-12 y la proteína del receptor beta2 de IL-12 sola cada una tiene una afinidad de unión baja para IL-12.

Conforme a esta invención, la proteína del receptor beta2 de IL-12 puede ser expresada sobre la superficie de una célula huésped.

Esta solicitud describe, no sólo a la proteína del receptor beta2 de IL-12, sino que también a los fragmentos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 que (1) tiene baja afinidad de unión para IL-12 y (2) que cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de IL-12 forma un complejo que tiene alta afinidad de unión. Los fragmentos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 pueden ser obtenidos por medios convencionales, tales como (i) degradación proteolítica de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, (ii) síntesis química por métodos rutinarios de la técnica, o (iii) métodos recombinantes estándar.

Para los objetivos de la presente invención, una proteína del receptor de IL-12 humana que tiene una alta afinidad de unión para IL-12 humano es una proteína que se une a IL-12 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 pM. Para los objetivos de la presente invención, una proteína del receptor de IL-12 humana que tiene una afinidad de unión baja para IL-12 humano es una proteína que se une a IL-12 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nM. La afinidad de unión de una proteína para IL-12 puede ser determinada por medios convencionales, como se describe en R. Chizzonite *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3117 y como se expone en adelante en el Ejemplo 5.

Los fragmentos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 también pueden ser medidos para detectar la afinidad de unión de IL-12 por medios convencionales, tal como se describe en R. Chizzonite *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3117

y como se expone en adelante en el Ejemplo 5. Los fragmentos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 pueden ser medidos para detectar la afinidad de unión de IL-12 solo o complejados con la proteína del receptor beta1 de IL-12, o un fragmento de la proteína del receptor beta1 de IL-12 que cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de IL-12 forma un complejo que tiene una alta afinidad de unión.

La presente solicitud también proporciona ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN, cADN, ARN, mARN, etc. que codifican las proteínas anteriores, por ejemplo, un complejo capaz de unirse a IL-12 humano con alta afinidad, comprendiendo el complejo a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, y la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, o sus fragmentos. Preferiblemente estos ácidos nucleicos codifican a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana tal como un ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO:1 y/o la proteína del receptor beta1 de IL-12 tal como un ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO:3. La presente solicitud también describe a vectores recombinantes que comprenden un ácido nucleico anterior, a vectores de expresión, y especialmente a vectores de expresión en los que el ácido nucleico anterior está operativamente unido para controlar las secuencias reconocidas por una célula huésped. La solicitud proporciona células huésped eucariotas y procariotas transformadas con uno o varios de los vectores anteriores y especialmente a células huésped en las que las proteínas o complejos son expresados sobre la superficie de las células huésped y a células huésped en las que estas células proliferan en presencia de IL-12. Las células huésped anteriores pueden ser transformadas con un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína del receptor beta2 de IL-12 como se define anteriormente y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína del receptor beta1 de IL-12 como se define anteriormente o con un vector individual que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína del receptor beta2 de IL-12 y un ácido nucleico que codifica una proteína del receptor beta1 de IL-12.

Como se usa en este documento, la expresión “ácido nucleico” se refiere a un polímero de ácidos nucleicos, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ácido nucleico más grande, que ha sido derivado a partir de un ácido nucleico aislado al menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, sin materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permita la identificación, manipulación y recuperación de la secuencia y sus secuencias de nucleótidos componentes por métodos bioquímicos estándar, por ejemplo, usando un vector de clonación. Tales secuencias son proporcionadas preferiblemente en la forma de un ADN o un cADN con un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que están típicamente presentes en genes eucariotas. Sin embargo, es evidente que también podría ser usado ADN genómico que contiene las secuencias relevantes. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes 5' ó 3' desde el marco de lectura abierto, donde el mismo no interfiere con la manipulación o la expresión de las regiones de codificación.

El “vector de expresión” es un elemento genético capaz de replicación en su propio control, tal como un plásmido, bacteriófago o cósmido, al cual otro segmento de ácido nucleico puede ser unido para causar la replicación del segmento unido. Esto comprende una unidad transcripcional que comprende una ensamble de (1) un elemento genético o elementos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores y potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que es transcrita en mRNA y traducida en la proteína, y (3) la iniciación de la transcripción apropiada y secuencias de terminación.

El “clon” es un grupo de moléculas de ADN idénticas derivadas a partir de una longitud original de secuencia de ADN y producida por una bacteria o virus usando técnicas de ingeniería genética, implicando a menudo a plásmidos.

Además, la solicitud describe una proteína purificada, recombinante, que comprende dos cadenas de polipéptidos diferentes (una proteína heterodimérica) que puede ser preparada por métodos conocidos. Las dos cadenas de polipéptidos diferentes son cada una codificadas por un polinucleótido quimérico diferente que tiene dos subsecuencias de ácidos nucleicos fusionadas en marco. La primera subsecuencia de ácidos nucleicos del primer polinucleótido quimérico, localizado en su extremo 5', es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un fragmento soluble de una proteína del receptor beta2 de IL-12. La segunda subsecuencia de ácidos nucleicos del primer polinucleótido quimérico, localizado en su extremo 3', es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. La primera subsecuencia de ácidos nucleicos del segundo polinucleótido quimérico, localizada en su extremo 5', es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12. La segunda subsecuencia de ácidos nucleicos del segundo polinucleótido quimérico, localizada en su extremo 3', es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante.

Los materiales de partida para las proteínas purificadas, recombinantes, de la solicitud pueden ser obtenidos por métodos conocidos en la técnica. En particular, sobre la base de la secuencia de ADN que codifica para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana descrita en la Figura 1 y de las secuencias de ácidos nucleicos ya conocidas para ciertos receptores, aquellas secuencias de ácidos nucleicos parciales que codifican para un fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 pueden ser determinadas y manipuladas a partir de la secuencia de ADN que codifica para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana descrita en la Figura 1 usando métodos conocidos, véase Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Asimismo, sobre la base de la secuencia de ADN que codifica para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana descrita en la Figura 3 y de la secuencia de ADN ya conocida para ciertos receptores, aquellas secuencias de ADN parciales que codifican para un fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana pueden ser determinadas y manipuladas a partir de la secuencia de ADN que codifica para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana descrita en la Figura

3 usando métodos conocidos, véase Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Se conocen fuentes para secuencias de ADN que codifican aisladas para los dominios constantes de inmunoglobulinas humanas en la técnica y son descritas, por ejemplo, en Ellison *et al.*, *Nucl. Acid Res.* **10**, 4071-4079 (1982) para IgG1 o Huck *et al.*, *Nucl. Acid Res.* **14**, 1779-1789 (1986) para IgG3.

La secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana puede ser fusionada en marco, por métodos conocidos [Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], a la secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. El polinucleótido quimérico resultante tiene localizado en su extremo 5' la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana y en su extremo 3' la secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de la cadena pesada de Ig humana excepto el primer dominio de la región constante.

Asimismo, la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana puede ser fusionada en marco, por métodos conocidos [Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], a la secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. El polinucleótido quimérico resultante tiene localizado en su extremo 5' la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y en su extremo 3' la secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana excepto el primer dominio de la región constante.

Los polinucleótidos quiméricos entonces pueden ser integrados usando métodos conocidos [Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] en vectores de expresión adecuados para la expresión en una célula de mamífero no humana, tal como una célula CHO. Para hacer la proteína homodimérica de la solicitud, el polinucleótido quimérico que tiene localizado en su extremo 5' la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana se integra en un vector de expresión adecuado. Para hacer la proteína heterodimérica de la invención, el polinucleótido quimérico que tiene localizado en su extremo 5' la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana y el polinucleótido quimérico que tiene localizado en su extremo 5' la secuencia de ADN aislada que codifica el fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana se integran en un vector de expresión individual adecuado, o dos vectores de expresión separados adecuados.

Preferiblemente, el(los) polinucleótido(s) quimérico(s) se co-transfecta(n) junto con un marcador seleccionable, por ejemplo, neomicina, higromicina, dihidrofolato reductasa (dhfr) o hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (hgpt) usando métodos que se conocen en la técnica. La secuencia de ADN establemente incorporada en el cromosoma puede ser amplificada posteriormente. Un marcador de selección adecuado para esto es, por ejemplo, dhfr. Las células de mamífero, por ejemplo, células CHO, que no contienen ningún gen intacto de dhfr, son así incubadas con cantidades crecientes de metotrexato después de que la transfección haya sido realizada. De esta manera, pueden ser obtenidas líneas celulares que contienen un número más alto de la secuencia de ADN deseada que las células no amplificadas.

El sistema de expresión de baculovirus también puede ser usado para la expresión de proteínas recombinantes en células de insecto. Las modificaciones postranslacionales realizadas por células de insecto son muy similares a las que se dan en células de mamífero. Para la producción de un baculovirus recombinante que expresa la proteína deseada se usa un vector de transferencia. Un vector de transferencia es un plásmido que contiene el(los) polinucleótido(s) quimérico(s) en el control de un promotor fuerte, por ejemplo, el de un gen poliedro, rodeado a ambos lados por secuencias virales. El vector de transferencia entonces es transfectado en las células de insecto junto con la secuencia de ADN del baculovirus de tipo silvestre. Los virus recombinantes que causan las células por recombinación homóloga pueden ser identificados entonces y aislados de acuerdo con métodos conocidos. Usando el sistema de expresión de baculovirus, las secuencias de ADN que codifican la parte de inmunoglobulina tienen que estar en forma de cADN.

La proteína recombinante expresada puede ser purificada, por ejemplo, por métodos conocidos. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de afinidad con proteína G para purificar la proteína homodimérica de la invención. La cromatografía de columna, o cualquier otro método que permita la diferenciación entre proteínas homodiméricas y proteínas heterodiméricas, puede ser usada para purificar la proteína heterodimérica de la invención.

Expresión de la proteína del receptor de IL-12 humana que tiene alta afinidad de unión a IL-12 humano:

El cADN de células de las que se sabe que se encuentra el receptor de IL-12 se incorpora por métodos convencionales en un huésped bacteriano para establecer una genoteca de cADN. Células PBMC PHA-activadas y de la línea celular Kit 225/K6 son ejemplos de fuentes de células para el cADN. El ARN de las células es extraído, caracterizado y transcrito en cADN monocatenario por métodos convencionales. El cADN monocatenario es convertido en cADN bicatenario por métodos convencionales. El cADN bicatenario se incorpora por técnicas convencionales en un vector de expresión, tal como pEF-BOS. El ADN del plásmido del vector de expresión entonces se incorpora en un huésped bacteriano por métodos convencionales para formar una genoteca de recombinantes.

La genoteca de cADN se rastrea mediante métodos de rastreo de expresión convencionales, como se describe en Hara y Miyajima, 1992, *EMBO*, **11**:1875, para los cADN, que cuando se expresan con el cADN para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, da lugar a un receptor de IL-12 humano de alta afinidad. Un pequeño número de

clones de la genoteca es cultivado en grupos. El ADN es extraído por métodos convencionales a partir de los grupos de clones. El ADN extraído a partir de un grupo de clones entonces es transfectado por métodos convencionales, con una pequeña cantidad de ADN a partir de un plásmido que contiene el cADN que codifica la proteína del receptor beta1 de IL-12 humano, en células huésped no humanas. Las células huésped no humanas son preferiblemente de mamífero, tal como las células COS. La IL-12 recombinante humana marcada es añadida entonces a las células huésped no humanas antes transfectadas como se describe anteriormente y se determina la señal de unión del grupo. Este procedimiento es repetido para cada grupo. Los grupos que muestran una señal de unión positiva para IL-12 pueden entonces ser divididos posteriormente en grupos más pequeños y analizados de nuevo de la manera anterior hasta que un clon individual sea seleccionado mostrando una señal de unión positiva.

El ADN del plásmido del clon seleccionado se secuencian en ambas cadenas usando métodos convencionales, tal como un secuenciador de ADN automatizado de ABI junto con una ADN polimerasa termoestable y didesoxinucleótidos marcados con tinte como terminadores. Las alineaciones de la secuencia de aminoácidos pueden ser llevadas a cabo como se describe en M. O. Dayhoffet *et al.*, *Methods Enzymology* **91**:524 (1983) con la matriz de datos de mutación, una falta de rotura de 6 y 100 corrimientos aleatorios.

El ADN del clon seleccionado entonces se co-transfecta por métodos convencionales con el ADN de un plásmido que contiene el cADN que codifica la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana en una célula huésped no humana, preferiblemente una célula de mamífero no humana tal como una célula COS o una célula Ba/F3.

De forma alternativa, por métodos recombinantes convencionales, puede ser manipulado un plásmido que contenga unidades de transcripción (promotor, cADN, y regiones polyA) tanto para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana como para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. El ADN del plásmido es transfectado por métodos convencionales en una célula huésped no humana, preferiblemente una célula de mamífero no humana tal como una célula COS o una célula Ba/F3.

El ADN puede ser aislado, el cual codifica la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, cuyo fragmento (1) tiene baja afinidad de unión para IL-12 humano y (2) cuando se compleja con la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, forma un complejo que tiene alta afinidad de unión con IL-12 humano.

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada se refiere a un polímero de ácido nucleico, en forma de un fragmento separado o como un componente de un construcción de ácidos nucleicos más grande, que ha sido derivado a partir del ácido nucleico aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura, es decir sin materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permita la identificación, manipulación y la recuperación de la secuencia y sus secuencias de nucleótidos componentes por métodos bioquímicos estándar, por ejemplo, usando un vector de clonación. Tales secuencias, por ejemplo, el ADN, preferiblemente se proporcionan en forma de un marco de lectura abierto no interrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, que están típicamente presentes en genes eucariotas. El ADN genómico que contiene las secuencias relevantes también podría ser usado como una fuente de secuencias codificantes. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes en 5' o 3' desde el marco de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones de codificación.

Una célula de mamífero que tiene la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o el complejo expresado sobre su superficie y que prolifera en respuesta a la IL-12 humana es útil para determinar la bioactividad de IL-12. Por ejemplo, tales células son útiles para determinar si un compuesto dado inhibe la actividad biológica de la IL-12 humana o es un agonista de IL-12.

Además, por la capacidad de expresarse de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana sobre una superficie celular de mamífero no humana, también se pueden expresar los fragmentos de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, y se puede determinar si estos fragmentos, cuando se complejan con la subunidad beta1, o su fragmento activo, tienen las mismas propiedades y una alta afinidad de unión para IL-12 como el complejo intacto.

El ADN aislado que codifica a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana puede ser usado para preparar una proteína purificada, recombinante, que sea soluble, y que se una a IL-12 con la misma afinidad que la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. El ADN aislado que codifica la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana también puede ser usado para preparar una proteína purificada, recombinante, que sea soluble, y que se una a IL-12 con la misma afinidad que el complejo del receptor de IL-12 recombinante humano de la proteína del receptor de beta1 con la proteína del receptor de beta2 [Véase, por ejemplo, Charnow, S. M. *et al.*, *Trends in Biotechnology*, Vol. **14**, 52-60 (1996)].

Tales proteínas purificadas, recombinantes, que se unen a IL-12 humano, son útiles para prevenir o tratar condiciones patológicas causadas por la actividad en exceso o inadecuada de células que poseen receptores de IL-12, inhibiendo la unión de IL-12 a tales células. Las condiciones patológicas causadas por la actividad en exceso de células que poseen receptores de IL-12 incluyen disfunciones autoinmunes, tales como, sin restricción, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y la esclerosis múltiple.

Una proteína purificada, recombinante, que es soluble, y que se une a IL-12 con la misma afinidad que la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana es la fusión de un fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana y una cadena pesada de Ig humana (tal como IgG, IgM o IgE, preferiblemente IgG) que tiene todos

los dominios excepto el primer dominio de la región constante. Esta proteína recombinante, que es homodimérica, está codificada por un polinucleótido quimérico que tiene 2 subsecuencias de ADN fusionadas en marco. La primera subsecuencia de ADN, en el extremo 5' del polinucleótido quimérico, es una secuencia de ADN aislada que codifica un fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. La segunda subsecuencia de ADN, localizada en el extremo 3' del polinucleótido quimérico, es una secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena humana pesada de Ig (preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. La proteína recombinante deseada puede ser generada por transfección del polinucleótido quimérico en una célula de mamífero no humana, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). La proteína recombinante expresada puede ser purificada, por ejemplo, por cromatografía de afinidad de la proteína G.

Una proteína purificada, recombinante, que es soluble, y que se une a IL-12 con la misma afinidad que el complejo del receptor de IL-12 recombinante humano del receptor de beta1 con el receptor de beta2 se codifica por dos polinucleótidos quiméricos, que cada uno tiene dos subsecuencias de ADN fusionadas en marco. La primera subsecuencia de ADN del primer polinucleótido quimérico, localizado en el extremo 5', es una secuencia de ADN aislada que codifica un fragmento soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. La segunda subsecuencia de ADN del primer polinucleótido quimérico, localizado en el extremo 3', es una secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. La primera subsecuencia de ADN del segundo polinucleótido quimérico, localizado en el extremo 5', es una secuencia de ADN aislada que codifica un fragmento soluble de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana. La segunda subsecuencia de ADN del segundo polinucleótido quimérico, localizado en el extremo 3', es una secuencia de ADN aislada que codifica todos los dominios de una cadena pesada de Ig humana (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, preferiblemente IgG) excepto el primer dominio de la región constante. La proteína recombinante deseada puede ser generada por la cotransfección de los dos polinucleótidos quiméricos en una célula de mamífero no humana, tal como una célula CHO. La proteína expresada puede ser purificada, por ejemplo, por cualquier método que permita la diferenciación de proteínas homodiméricas a partir de proteínas heterodiméricas, tales como, por ejemplo, la cromatografía de columna.

Además, la solicitud también proporciona un procedimiento para la preparación de una proteína anteriormente mencionada que comprende la expresión de un ácido nucleico anteriormente mencionado en una célula huésped adecuada.

Además, también pueden ser producidos por métodos conocidos anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, o el complejo, [Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, ed. por Coligan, J.E. *et al.*, J. Wiley y Sons (1992)] y usado para impedir o tratar condiciones patológicas causadas por una actividad en exceso de células que poseen receptores de IL-12 inhibiendo la unión de IL-12 en tales células.

Las proteínas recombinantes purificadas son útiles para prevenir o tratar condiciones patológicas causadas por la actividad en exceso o inadecuada de células que poseen receptores de IL-12 inhibiendo la unión de IL-12 en tales células.

El término "purificado", según se usa para definir la pureza de una proteína recombinante codificada por las secuencias de ADN combinadas descritas anteriormente, o sus composiciones proteicas, significa que la proteína o la composición proteica está sustancialmente sin otras proteínas de origen natural o endógeno y contiene menos de aproximadamente el 1% en masa de contaminantes de proteína residuales de procesos de producción. Tales composiciones, sin embargo, pueden contener otras proteínas añadidas tales como estabilizadores, cardas, excipientes o sustancias co-terapéuticas. Una proteína es purificada si es detectable, por ejemplo, como una banda de proteína individual en un gel de poli-acrilamida mediante tinción de plata.

Pueden ser administradas proteínas recombinantes purificadas como se describe anteriormente (así como anticuerpos frente a proteínas del receptor beta2 de IL-12 humanas y sus fragmentos, y anticuerpos frente al complejo de esta invención) en el tratamiento clínico de disfunciones autoinmunes, tales como, sin restricción, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino y la esclerosis múltiple.

Las proteínas recombinantes purificadas descritas anteriormente (así como los anticuerpos frente a proteínas del receptor beta2 de IL-12 humanas y sus fragmentos, y los anticuerpos frente al complejo de esta invención) pueden ser usadas en combinación con otros antagonistas de citoquina tales como anticuerpos frente al receptor de IL-2, el receptor de TNF soluble (factor de necrosis tumoral), el antagonista de IL-1, y similares para tratar o prevenir los trastornos o las condiciones anteriores.

Además, la solicitud describe composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína o un anticuerpo mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios antagonistas de citoquina.

Además, la solicitud proporciona el uso de una proteína o un anticuerpo mencionado anteriormente para la preparación de un medicamento. Estos compuestos son especialmente útiles para el tratamiento de disfunciones autoinmunes.

Los intervalos de dosis para la administración de las proteínas recombinantes purificadas descritas anteriormente (así como anticuerpos frente a las proteínas del receptor beta2 de IL-12 humanas y sus fragmentos, y los anticuerpos frente al complejo de esta solicitud) pueden ser determinados por los expertos ordinarios en la técnica sin una experimentación excesiva. En general, las dosificaciones apropiadas son las que son lo bastante grandes para producir el efecto deseado, por ejemplo, bloqueando la unión de IL-12 endógeno frente a su receptor natural. La dosificación no debería ser tan grande que causara efectos secundarios adversos, tales como reacciones inespecíficas no deseadas, reacciones anafilácticas, y otras por el estilo. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y el grado de enfermedad en el paciente, indicaciones contrarias, si existiera alguna, la tolerancia inmune y otras tales variables, siendo ajustada por el médico individual. Las proteínas recombinantes purificadas descritas anteriormente (así como los anticuerpos frente a las proteínas del receptor beta2 de IL-12 humanas y sus fragmentos, y los anticuerpos frente al complejo de esta solicitud) pueden ser administrados parenteralmente por inyección o por perfusión gradual con el tiempo. Pueden ser administrados intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente o subcutáneamente.

Los intervalos de dosis para la administración de las proteínas del receptor de IL-12 y sus fragmentos pueden ser determinados por los expertos ordinarios en la técnica sin una experimentación excesiva. En general, las dosificaciones apropiadas son las que son lo bastante grandes para producir el efecto deseado, por ejemplo, bloqueando la unión de IL-12 endógena frente a su receptor natural. La dosificación no debería ser tan grande que causara efectos secundarios adversos, tales como reacciones inespecíficas no deseadas, reacciones anafilácticas, y otras por el estilo. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y el grado de enfermedad en el paciente, indicaciones contrarias, si existiera alguna, la tolerancia inmune y otras tales variables, siendo ajustada por el médico individual. El intervalo de dosis esperado es de aproximadamente 1 ng/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día. Las proteínas del receptor de IL-12 y sus fragmentos pueden ser administradas parenteralmente por inyección o por perfusión gradual con el tiempo. Pueden ser administrados intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente o subcutáneamente.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones de alcohol/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lacteado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de fluidos y sustancias nutritivas, rellenos de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y otros por el estilo. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes anti-microbianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes y otros por el estilo. Véase, generalmente, "Remington's Pharmaceutical Science", 16ª Ed., Mack Eds., 1980.

Ensayos para determinar si un compuesto dado bloquea la actividad de IL-12:

La solicitud describe el uso de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o del complejo de esta invención como un agente de rastreo para productos farmacéuticos. Conforme a esta solicitud, se puede determinar si un compuesto dado bloquea la actividad de IL-12 humano o actúa como un agonista de IL-12.

Una actividad biológica de IL-12 humano es la estimulación de la proliferación de células T y NK activadas. La proliferación de células T activadas causa respuestas inmunes inducidas por aloantígenos, tales como el rechazo alo-injerto (tales como trasplantes de piel, riñón y corazón) y reacción de injerto-contrahuésped en pacientes que han recibido trasplantes de médula ósea. Esta actividad biológica de IL-12 humano es mediada por la unión de las moléculas de IL-12 humano a receptores de la superficie celular en células T activadas.

Un compuesto que bloquea la actividad de IL-12 humano, por lo tanto, inhibiría la proliferación de células T activadas y sería útil para tratar o prevenir respuestas inmunes inducidas por aloantígenos.

Para determinar si un compuesto bloquea la actividad de IL-12 humano, primero, se proporciona una pluralidad de células que tienen expresada sobre su superficie la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o sus fragmentos, o el complejo de la invención, cuyas células proliferan en presencia de IL-12 humano. La proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o sus fragmentos se unen a IL-12 humano con una afinidad de unión baja, pero cuando se complejan con la proteína del receptor de beta1 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12 humano. El complejo de la invención se une a IL-12 humano con alta afinidad de unión y comprende un complejo de (1) la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, que cuando se compleja con la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión frente a IL-12 humano, y (2) la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, o sus fragmentos, que cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de IL-12 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión frente a IL-12 humano. Segundo, se ponen en contacto las células con IL-12 humano y el compuesto dado. Tercero, se determina si la presencia del compuesto dado inhibe la proliferación de las células.

Para determinar si un compuesto es un agonista de IL-12 humano, primero, se proporciona una pluralidad de células que tienen expresada sobre su superficie la proteína del receptor beta2 de IL-12 o sus fragmentos, o el complejo de la invención, y cuyas células proliferan en presencia de IL-12 humano. La proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o sus fragmentos se unen a IL-12 humano con una afinidad de unión baja, pero cuando se compleja con la proteína del receptor beta1 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión para IL-12 humano. El complejo de la

invención se une a IL-12 humano con alta afinidad de unión y comprende un complejo de (1) la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, que cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de IL-12 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión frente a IL-12 humano, y (2) la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, o sus fragmentos, que cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de IL-12 humana forma un complejo que tiene alta afinidad de unión frente a IL-12 humano. Segundo, se ponen en contacto las células con IL-12 humano o el compuesto dado. Tercero, se determina si la presencia del compuesto dado estimula la proliferación de las células.

Los ejemplos de células capaces de expresar sobre su superficie el complejo, cuyas células proliferan en presencia de IL-12 humano incluyen, sin restricción, PBMC activado con PHA, células Kit 225/K6 y células Ba/F3 transfectadas con cADN tanto para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana como para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana. Los ejemplos de células capaces de expresar sobre su superficie la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, cuyas células proliferan en presencia de IL-12 humano incluyen, sin restricción, células Ba/F3 transfectadas con cADN para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana.

Para determinar si la presencia del compuesto dado inhibe la proliferación de las células, puede ser llevado a cabo el procedimiento siguiente. Las células sensibles a IL-12 humano, que han expresado sobre su superficie la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, o el complejo del receptor de IL-12 humano de la invención, se ponen en placas en los pocillos de una placa de microtítulo. El IL-12 humano entonces es añadido a algunos pocillos de la placa de microtítulo (pocillos estándar) y se deja reaccionar con las células. El compuesto que se analiza se añade antes o simultáneamente con IL-12 humano a los diferentes pocillos de la placa de microtítulo (pocillos de la muestra) y se deja reaccionar con las células. Cualquier disolvente usado debe ser no tóxico para la célula. La proliferación de las células entonces es medida por métodos conocidos, por ejemplo, marcando las células después del contacto con IL-12 humano y el compuesto (tal como por la incorporación de timidina tritiada en el ADN de replicación), midiendo la acumulación de metabolitos celulares (tal como el ácido láctico), y otros por el estilo. La proliferación de las células de los pocillos estándar es comparada con la proliferación de las células de los pocillos de la muestra. Si las células de los pocillos de la muestra proliferan considerablemente menos que las células de los pocillos estándar, el compuesto bloquea la actividad de IL-12.

Para determinar si la presencia del compuesto dado simula la proliferación de las células, puede ser llevada a cabo el procedimiento siguiente. Las células sensibles a IL-12 humano que han expresado sobre su superficie la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o sus fragmentos, o el complejo del receptor de IL-12 humano de la invención se ponen en placas en los pocillos de una placa de microtítulo. La IL-12 humana entonces se añade a algunos pocillos de la placa de microtítulo (pocillos estándar) y se deja reaccionar con las células. El compuesto que se analiza se añade a los pocillos diferentes de la placa de microtítulo (pocillos de la muestra) y se deja reaccionar con las células. Cualquier disolvente usado debe ser no tóxico para la célula. La proliferación de las células entonces es medida por métodos conocidos, por ejemplo, marcando las células después del contacto con el compuesto (tal como por la incorporación de timidina tritiada en el ADN de replicación), midiendo la acumulación de metabolitos celulares (tal como el ácido láctico), y otros por el estilo. La proliferación de las células de los pocillos estándar es comparada con la proliferación de las células de los pocillos de la muestra. Si las células de los pocillos de la muestra proliferan considerablemente más que las células que no fueron expuestas a IL-12 humano, el compuesto es un agonista de IL-12 humano.

En consecuencia, la presente solicitud describe un método para seleccionar compuestos útiles para la inhibición de la actividad de IL-12 o compuestos útiles como los agonistas de la actividad de IL-12, que comprende poner en contacto un compuesto que se sospecha que inhibe la actividad de IL-12 o que es un agonista de actividad de IL-12, con una proteína mencionada anteriormente, seguido de la detección del efecto biológico.

Los ejemplos siguientes son ofrecidos para su ilustración, no para su limitación.

50 Ejemplos

Materiales y métodos

1. Proteínas, Plásmidos y Cepas

La IL-12 recombinante humana fue obtenida como se describe en esta publicación (U. Gubler *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:4143).

La IL-2 recombinante humana fue obtenida como se describe en esta publicación (H.W. Lahm *et al.*, 1985, *J. Chromatog.*, **326**:357).

El plásmido pEF-BOS está basado en una estructura pUC 119 y contiene el promotor alfa del factor de elongación 1 para dirigir la expresión de genes insertados en el sitio BstXI (S. Mizushima y S. Nagata, *Nucl. Acids Res.*, 1990, **18**:5322).

El cADN del receptor beta1 de IL-12 humano en el plásmido pEF-BOS fue obtenido como se describe en A. Chua *et al.*, 1994, *J. Immunology* **153**:128 y en la publicación de solicitud de patente europea N°. 0638644.

La DH-10B de *E. coli* electrocompetente (S. Grant *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**:4645) fue obtenida del laboratorio de investigación Bethesda (Bethesda, Maryland).

2. Marcaje de IL-12 humano con ^{125}I

Se marcó a IL-12 recombinante humano con ^{125}I como sigue. El yodogen fue disuelto en cloroformo. Alícuotas de 0,05 mg de yodogen fueron secadas en tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 150 mm. Para el radiomarcaje, fue añadido Na^{125}I 1,0 mCi al tubo de vidrio de borosilicato revestido con yodogen, que también contenía 0,05 ml de tampón de yodación-Tris (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,4 M y EDTA 1 mM) para formar una disolución de ^{125}I . La disolución de ^{125}I fue activada incubando durante 6 minutos a temperatura ambiente. La solución de ^{125}I activada fue transferida a un tubo que contenía de 0,05 a 0,1 ml de IL-12 recombinante humano (31,5 mg) en tampón de yodación Tris. La mezcla resultante de la solución de ^{125}I activada y la IL-12 recombinante humana fue incubada durante 6 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, fueron añadidos 0,05 ml de tampón de paro de yodogen (tirosina del 10 mg/ml, glicerol del 10% en solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco (PBS), pH 7,40) y se hizo reaccionar durante 3 minutos. La mezcla resultante entonces fue diluida con 1,0 ml de tampón Tris-yodación que contenía albúmina de suero bovina del 0,25% (BSA), y fue aplicada a una columna de desalación P10DG de Bio-Gel para realizar la cromatografía. La columna fue eluida con tampón Tris-yodación que contenía 0,25% de BSA. Fracciones de 1 ml que contenían las cantidades eluidas máximas de IL-12 recombinante humano marcado fueron combinadas. Las fracciones combinadas fueron diluidas a 1×10^8 cpm/ml con 1% de BSA en tampón Tris-yodación. La incorporación de ^{125}I en IL-12 recombinante humano fue controlada por la precipitación con ácido tricloroacético (TCA). La radiactividad del TCA precipitable (concentración final de 10% de TCA) fue típicamente superior al 95% de la radiactividad total. La actividad radioespecífica del IL-12 recombinante humano marcado fue típicamente de 1000 a 2000 cpm/fmol.

Ejemplo 1

Preparación de linfoblastos activados con PHA humanos

Fueron aisladas células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de la sangre recogida de donantes sanos como se describe en Gately *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* **69**, 1245 (1982). La sangre fue recogida en jeringuillas heparinizadas, fue diluida con un volumen igual de la solución salina equilibrada de Hank y fue estratificada en medio de separación de linfocitos (LSM[®] obtenido de la empresa Organon Teknika, Durham, Carolina del Norte) en tubos. Se centrifugaron los tubos a 2000 revoluciones por minuto durante 20 minutos a temperatura ambiente. El PBMC en el interfaz de la solución de sangre acuosa y el medio de separación de linfocitos fueron recogidos. El PBMC recogido fue granulado a 1500 revoluciones por minuto durante 10 minutos a través de un relleno de 15 ml de sacarosa del 20% en solución salina equilibrada de Hank. El PBMC granulado fue resuspendido en medio de cultivo de tejido (mezcla 1:1 de RPMI 1640 y medio Eagle modificado de Dulbecco, suplementado con aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 60 mg/ml de arginina HCl, tampón Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, y 1 mg/ml de dextrosa) (TCM) más suero humano del 5% y fue lavado dos veces en TCM.

El PBMC entonces fue activado para formar linfoblastos. En particular, $0,5 - 1 \times 10^6$ células/ml en TCM más suero humano del 5% más 0,1% (v/v) de PHA-P (Difco, Detroit, MI) fue cultivado durante 3 días a 37°C en una atmósfera de CO_2 del 5%.

Después de tres días, los cultivos celulares fueron divididos 1:1 en volumen en TCM más suero humano del 5% y 50 U/ml de IL-2 recombinante humano para proporcionar > 95% de células T. Estas células fueron utilizadas para la preparación de una genoteca de cADN.

Ejemplo 2

Extracción y caracterización de ARN

PBMC aislados como en el Ejemplo 1, activados con PHA durante 2-3 días, fueron cultivados y el ARN total fue extraído usando isotiocianato de guanidina/fenol como se describe en P. Chomczynski y N. Sacchi, *Anal. Biochem.*, **162**:156, 1987. Fue aislado el ARN de PolyA⁺ del ARN total por una adsorción estacionaria a perlas de látex de oligo dT como ha sido descrito (K. Kuribayashi *et al.*, Serie del Simposio de *Nucl. Acids Res.* **19**:61, 1988). El rendimiento en masas de esta purificación fue de aproximadamente el 4% de ARN de PolyA⁺.

Ejemplo 3

Genoteca de cADN

A partir del ARN de PolyA⁺ anterior, fue establecida una genoteca de cADN en el vector de expresión pEF-BOS de mamífero como sigue.

3 mg del ARN de PolyA⁺ fueron retrotranscritos en cADNs monocatenarios usando RNasaH menos transcriptasa inversa en presencia de un ³²P-dCTP. Los cADN monocatenarios resultantes fueron convertidos en cADN bicatenarios de extremo romo como se describe en U. Gubler y A. Chua, Volumen II de "Essential Molecular Biology Volume", T.A. Brown, editor, pp. 39-56, IRL Press 1991. Los enzimas BstXI (A. Aruffo y B. Seed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) **84**, 8573, 1987) fueron ligados a los cADN bicatenarios resultantes.

Las moléculas de cADN que tenían un tamaño mayor que 800 pares de bases (bp) fueron rastreadas por cromatografía de exclusión de tamaños como sigue. Una columna Sephacryl SF 500 (0,8 x 29 cm) fue empacutada por gravedad en Tris-HCl 10 mM, pH 7,8 - EDTA 1 mM - NaAcetato 100 mM. El cADN radiactivo con enzimas BstXI añadidos fue aplicado a la columna y fueron recogidas fracciones de 0,5 ml. La distribución de tamaños del cADN radiactivo fue determinada realizando la electroforesis en una pequeña alícuota de cada fracción en un gel de agarosa del 1%, secando el gel, y visualizando el tamaño por la exposición del gel a una película de rayos X. Las moléculas de cADN más grandes de 800 bp fueron rastreadas por tamaño de esta manera.

Las moléculas de cADN seleccionadas fueron reunidas y concentradas por precipitación con etanol. Las moléculas de cADN reunidas y concentradas seleccionadas fueron ligadas posteriormente al plásmido pEF-BOS como sigue. El plásmido había sido restringido con BstXI y purificado en dos geles de agarosa del 1% consecutivos. 300 ng del ADN del plásmido restringido y purificado fueron ligados a 30 ng de cADN seleccionado por tamaños en 60 ml de tampón de ligadura (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 - MgCl₂ 10 mM - DTT 10 mM - rATP 1 mM - 25 mg/ml de BSA) a 15°C de la noche a la mañana.

Al día siguiente, el plásmido ligado con el cADN seleccionado por tamaños fue extraído con fenol. Fueron añadidos 6 mg de glucógeno de mejillón al extracto resultante, y los ácidos nucleicos fueron precipitados con etanol. El precipitado resultante fue disuelto en agua y los ácidos nucleicos fueron reprecipitados con etanol, seguido de un lavado con etanol del 80%. Un pelete fue formado a partir de los ácidos nucleicos precipitados y lavados. El pelete fue disuelto en 6 ml de agua. Alícuotas de 1 ml del pelete disuelto posteriormente fueron electroporadas en cepas DH-10B de *E. Coli*. Bajo la electroporación de 5 alícuotas paralelas, fue generada una genoteca de aproximadamente 10 millones de recombinantes.

Ejemplo 4

Rastreo de expresión para los cADN que codifican receptores de IL-12 de alta afinidad

La genoteca fue rastreada de acuerdo con el método de rastreo de expresión general descrito por Hara y Miyajima, 1992, *EMBO*, **11**:1875.

Grupos de aproximadamente 100 clones de *E. coli* de la genoteca anterior fueron cultivados y el ADN del plásmido fue extraído a partir de los grupos por métodos convencionales. 2 x 10⁵ células COS fueron puestas en placas por cultivo de pocillos de 35 mm. Fueron transfectadas células COS con un cóctel de transfección usando la técnica de DEAE dextrano estándar descrita en "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", 2ª ed., J. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 ("Molecular Cloning"). El cóctel de transfección contenía (1) 1 mg de ADN del plásmido extraído a partir de los grupos del clon de *E. Coli* derivados a partir de la genoteca anterior, y (2) 0,1 mg de ADN del plásmido pEF-BOS que contenía el cADN del receptor beta1 de IL-12 humano.

3 días después de la transfección, los pocillos de células COS fueron incubados con IL-12 recombinante humano marcado 10 pM (actividad específica = 1000-2000 cpm/fmol) durante 90 minutos a temperatura ambiente. El IL-12 recombinante humano marcado fue retirado, y la monocapa de células COS fue lavada durante una hora tres veces con tampón de unión (RPMI 1640, suero bovino fetal del 5% (FBS), HEPES 25 mM, pH 7) para después seleccionar las células COS que expresaban sólo receptores de IL-12 de alta afinidad (la unión del ligando de IL-12 frente a los sitios de afinidad baja fue después reducida porque los sitios de afinidad baja tienen una velocidad de disociación más alta). Posteriormente, las monocapas de células fueron lisadas e incluidas en un contador gamma. Después del rastreo de 440 grupos (representando a aproximadamente 44.000 clones), un grupo mostró coherentemente una señal de unión positiva (300 cpm en una línea de fondo de 100 cpm). A partir de este grupo, un clon individual fue aislado posteriormente por selección filial. Este clon individual (B5-10) contenía un inserto de cADN de aproximadamente 3 kilobytes que fue completamente secuenciado.

El inserto de cADN del clon B5-10 era incompleto con respecto a la región que codificaba a la proteína porque no contenía un codon de terminación en marco. La genoteca de cADN del Ejemplo 3 fue rastreada de nuevo mediante técnicas de hibridación de ADN convencionales con el inserto de cADN a partir del clon B5-10, como se describe en "Molecular Cloning" y en Grunstein y Hogness, 1975, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**:3961. Clones adicionales fueron aislados de este modo y luego fueron parcialmente secuenciados. La secuencia de nucleótidos de un clon (Nº. 3) fue encontrada que (i) sobrelapaba con el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos del clon B5-10, (ii) se extendía más allá de la secuencia de nucleótidos del clon B5-10 y (iii) contenía un codon de terminación en marco.

Esta secuencia de ADN compuesta se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO:1). En la Figura 2 se muestra la secuencia de aminoácidos deducida para la proteína del receptor codificada. Basado en la nomenclatura antes sugerida de Stahl y Yancopoulos, 1993, *Cell* **74**:587, los inventores llaman a la cadena del receptor de IL-12 humana recién aislada la cadena beta2.

Ejemplo 5

Ensayos de unión

Fueron transfectadas células COS (4×10^7) por electroporación usando un Gene Pulser de BioRad (250 mF, 250 voltios) con (1) 25 mg del ADN del plásmido de B5-10 que expresaba la proteína del receptor beta2 de IL-12 recombinante humana, (2) 25 mg del ADN del plásmido pEF-BOS que expresaba a la proteína del receptor beta1 de IL-12 recombinante humana, o (3) una mezcla de 12,5 mg del ADN del plásmido de B5-10 que expresaba a la proteína del receptor beta2 de IL-12 recombinante humana y 12,5 mg del ADN del plásmido pEF-BOS que expresaba a la proteína del receptor beta1 de IL-12 recombinante humana. Las células electroporadas fueron puestas en placas en una placa de cultivo de 600 cm², fueron recolectadas después de 72 horas raspando, lavando y resuspendiéndolas en tampón de unión.

Las células fueron analizadas para determinar las afinidades de los receptores de IL-12 expresados para IL-12 humano. En particular, la unión en equilibrio de IL-12 recombinante humano marcado con las células fue realizada y analizada como se describe en R. Chizzonite, *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3117. Las células electroporadas (8×10^4) fueron incubadas con concentraciones crecientes de IL-12 recombinante I¹²⁵-marcado humano a temperatura ambiente durante 2 horas. Las incubaciones fueron llevadas a cabo en dos muestras o por triplicado.

La radiactividad unida a las células fue separada a partir del IL-12 marcado con ¹²⁵I libre por centrifugación de la mezcla de células electroporadas e IL-12 humano recombinante marcado con ¹²⁵I a través de 0,1 ml de una mezcla de aceite (mezcla 1:2 de Thomas Silicone Fluid 6428-R15 {A.H. Thomas} y aceite de silicona AR 200 {Gallard-Schlessinger}) a 4°C durante 90 segundos a 10.000 x g para formar un pelete de células en un tubo. El pelete de células fue excindido desde la punta del tubo en el cual fue formado, y la radiactividad de las células unidas fue determinada en un contador gamma.

Fueron analizados los datos de unión del receptor y las afinidades fueron calculadas de acuerdo con Scatchard usando el método descrito por McPherson, J., 1985, *Pharmacol. Methods*, **14**:213.

Ejemplo 6

Producción de la línea celular sensible a IL-12

Células Ba/F3 tipo silvestre, una célula pro-B de ratón dependiente de IL-3 (Palacios, R. *et al.*, 1985, *Cell* **41**:727) y células Ba/F3 que expresan a la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana (Chua, A., *et al.*, 1994, *J. Immunology* **153**:128) fue cotransfectada con (1) 80 mg de ADN del plásmido pEF-BOS que expresa la proteína del receptor beta2 de IL-12 recombinante humano y (2) 8 mg del plásmido que expresa el gen de la resistencia a la higromicina (Giordano, T.J., *et al.*, 1990, *Gene* **88**:285) por electroporación usando un Gene Pulser BioRad (960 mF, 400 voltios).

Todas las células fueron resuspendidas a una densidad de 2×10^5 células/ml viables en un medio de crecimiento de RPMI 1640, 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), y medio del 10% condicionado a partir de la línea celular WEHI-3 (Nº. ATCC TIB 68, Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, Maryland). La línea celular WEHI-3 es una fuente de IL-3. Las células resuspendidas entonces fueron incubadas a 37°C bajo CO₂ del 5% durante 120 horas.

Las células fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en (1) el medio de crecimiento anterior en presencia de 1 mg/ml de higromicina o (2) un medio de crecimiento de RPMI 1640 que contenía IL-12, 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina G (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), y varias concentraciones (10, 50 ó 250 ng/ml) de IL-12 humano.

Células Ba/F3 que expresan a la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana transfectadas con el ADN del plásmido pEF-BOS que expresaba la proteína del receptor beta2 de IL-12 recombinante humana cultivada en el medio de crecimiento que contenía IL-12, demostrando que la coexpresión de la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana conferían sensibilidad de IL-12 humano a las células Ba/F3.

Además, las células Ba/F3 que expresaban a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana crecían en el medio de crecimiento que contenía IL-12, demostrando que la expresión de la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana confería sensibilidad de IL-12 humano a las células Ba/F3.

Ejemplo 7

Efecto de IL-12 humano en líneas celulares Ba/F3 transfectadas

5 Células Ba/F3 (1) que expresaban la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, (2) que expresaban la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, o (3) que coexpresaban la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con FBS del 10%, 100 U/ml de penicilina G, 100 mg/ml de estreptomycin, y L-glutamina 2 mM a 2×10^4 células/pocillo en microplacas de fondo plano Costar 3596 durante 24 horas. Varias diluciones de IL-12 humano, como se muestra en la Figura 6, fueron añadidas entonces a las microplacas y las células fueron incubadas durante 42 horas a 37°C en una atmósfera humedecida del 5% de CO₂ en aire. 50 ml de ³H-timidina, 10 mCi/ml en medio de cultivo, fueron añadidos entonces a cada pocillo. Los cultivos fueron incubados después durante 6 horas a 37°C. Posteriormente, el contenido del cultivo fue recolectado en filtros de fibra de vidrio mediante una cultivadora de células. La incorporación de ³H-timidina fue medida por el uso de un contador de centelleo líquido. Todas las muestras fueron analizadas por cuádruplicado.

Ejemplo 8

Análisis de secuencia de clones de cADN del receptor de IL-12 y proteína del receptor de IL-12 codificada

La proteína del receptor beta2 de IL-12, compuesta de 862 aminoácidos y un peso molecular calculado de 97231, tenía las propiedades siguientes: péptido señal N-terminal, dominio extracelular, dominio transmembrana y cola citoplásmica. Se predijo que el péptido señal N-terminal hidrófobo clásico tenía 23 aminoácidos de longitud. La división del péptido señal ocurre sobre todo después de los aminoácidos Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Gln (von Heijne, G., 1986, *Nucl. Acids Research*, **14**:4683). Para el receptor de IL-12, la división podría ocurrir así después de Ala23 en la secuencia mostrada en la Figura 2, dejando una proteína madura de 839 aminoácidos basado en la división en Ala23. El dominio extracelular del receptor se predijo que abarcaba la región desde el extremo C-terminal del péptido señal al aminoácido N°. 622 en la secuencia mostrada en la Figura 2. El análisis de hidrofobia muestra que el área desde el aminoácido N°. 623 al 646 es hidrófoba, como se esperaría para una región de ancla transmembrana. Los restos de parada de transferencia cargados pueden ser encontrados en el extremo N-terminal así como en el extremo C-terminal de esta zona de transmembrana predicha. El dominio extracelular del receptor es así de 599 aminoácidos y contiene los 9 sitios de glicosilación predichos unidos por N. La parte citoplásmica tiene 215 aminoácidos (resto de aminoácidos números de 647 a 862).

Otros análisis de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 muestran que la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana es un miembro de la superfamilia del receptor de citoquina, en virtud de los elementos de secuencia [Cys132---Cys143TW] y [W305SKWS]. Comparando la secuencia mostrada en la Figura 2 con todos los miembros de la superfamilia con el programa ALIGN se muestra que la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana tiene la homología más alta con gp130 humano. La región citoplásmica de la cadena del receptor beta2 de IL-12 contiene los motivos de caja 1 y 2 encontrados en otros miembros de la superfamilia del receptor de citoquina, así como tres restos de tirosina. La fosforilación de tirosinas está asociada comúnmente a la señalización del receptor de citoquina; la presencia de estos restos de tirosina subraya la importancia de la cadena del receptor beta2 de IL-12 en la formación de un receptor de IL-12 funcional. La cadena del receptor beta1 de IL-12 no contiene ningún resto de tirosina en su cola citoplásmica.

Ejemplo 9

Análisis de los ensayos de unión

Los resultados de los ensayos de unión son mostrados en la Figura 5.

Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, IL-12 humano se une al receptor beta1 o beta2 de IL-12 recombinante solo con una afinidad aparente de aproximadamente 2-5 nM. Los datos de unión fueron descritos por un modelo de receptor de sitio solo, correspondiente al componente de afinidad baja del receptor de IL-12 funcional encontrado en PBMC activado con PHA (R. Chizzonite *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3117; B. Desai *et al.*, 1992, *J. Immunol.*, **148**:3125).

En contraste con estos resultados, como se muestra en la Figura 5C, fueron generados tanto sitios de unión de IL-12 de afinidad alta como baja en la cotransfección de células COS con plásmidos del receptor beta1 y beta2 de IL-12. En este caso, los datos de unión fueron descritos mediante un modelo de dos sitios de receptor, con afinidades de 50 pM y 5 nM.

Ejemplo 10

Efecto de IL-12 humano en líneas celulares de Ba/F3 transfectadas

5 Se muestran los resultados del ensayo de proliferación para el efecto de IL-12 humano en células Ba/F3 (1) que expresaban la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana, (2) que expresaban la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana, y (3) que coexpresaban la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana en la Figura 6.

10 Las células que son transfectadas con cADN tanto para la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana como para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana responden a la estimulación por IL-12 humano proliferando en una manera dependiente de la dosis.

15 Además, las células que son transfectadas con los cADN para la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana responden a la estimulación por IL-12 humano proliferando en una manera dependiente de la dosis.

20 Por consiguiente, el cADN aislado (clon N°. B5-10, SEQ.ID. NO:1) que codifica para una proteína transmembrana tipo I representa un segundo componente del receptor de IL-12 (IL-12R beta2) encontrado en células T humanas normales. Las cadenas beta1 y beta2 cada una se unen solo a IL-12 sólo con afinidad baja ($K_d = 2-5$ nM). En la coexpresión de beta1 y beta2, son observados dos sitios de afinidad, con valores de K_d de 50 pM y 5 nM.

Células Ba/F3 que expresan a la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana o que coexpresan a la proteína del receptor beta1 de IL-12 humana y la proteína del receptor beta2 de IL-12 humana son sensibles a IL-12 humano.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo dirigido contra una proteína del receptor beta2 de interleuquina 12 (IL-12) con baja afinidad de unión, o sus fragmentos, cuya proteína del receptor es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:1,

(a) tiene una baja afinidad de unión para IL-12 desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nM, y

10 (b) cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de interleuquina-12 (receptor $\beta 1$ de IL-12) forma un complejo que tiene una alta afinidad de unión para IL-12 desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 pM,

15 en el que el fragmento de una proteína del receptor beta2 de interleuquina-12 de baja afinidad de unión tiene la secuencia de aminoácidos de una parte de una proteína del receptor beta2 de interleuquina-12 y las propiedades (a) y (b) anteriores.

20 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la proteína del receptor beta2 de IL-12 comparte al menos una homología de secuencia del 80% con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el receptor beta2 de IL-12 comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2, o su forma alélica o variante.

25 4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el receptor beta2 de IL-12 es soluble y es codificado por un ácido nucleico, cuyo ácido nucleico comprende una subsecuencia (a) y una subsecuencia (b), en el que dicha subsecuencia (a) codifica una forma soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 y la subsecuencia (b) codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig distintos que el primer dominio de dicha región constante.

30 5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1, dirigido además contra un complejo que se une a IL-12 con una alta afinidad de unión desde aproximadamente 5 a 100 pM, cuyo complejo comprende:

35 (i) una proteína del receptor beta2 de IL-12, o sus fragmentos, cuya proteína del receptor es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:1,

40 cuya proteína del receptor

(a) tiene una afinidad de unión baja para IL-12 desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nM, y

45 (b) cuando se compleja con una proteína del receptor beta1 de interleuquina-12 (receptor $\beta 1$ de IL-12) forma un complejo que tiene una alta afinidad de unión para IL-12 desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 pM,

50 (ii) una proteína del receptor beta2 de IL-12, o sus fragmentos, cuya proteína del receptor es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótido representada en SEQ ID NO:3,

cuya proteína del receptor

(a) tiene una afinidad de unión baja para IL-12 desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nM, y

55 (b) cuando se compleja con una proteína del receptor beta2 de interleuquina-12 (receptor $\beta 1$ de IL-12) forma un complejo que tiene una alta afinidad de unión para IL-12 desde aproximadamente 5 a aproximadamente 100 pM,

60 en el que el fragmento de una proteína del receptor beta2 de interleuquina 12 de baja afinidad de unión tiene la secuencia de aminoácidos de una parte de una proteína del receptor beta2 de IL-12 y las propiedades (a) y (b) anteriores, y en el que el fragmento de una proteína del receptor beta1 de IL-12 tiene la secuencia de aminoácidos de una parte de la proteína del receptor beta1 de IL-12 y las propiedades (a) y (b) anteriores.

65 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la proteína del receptor beta2 de IL-12 comparte al menos una homología de secuencia del 80% con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2.

ES 2 305 024 T3

8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que la proteína del receptor beta2 de IL-12 comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:2, su forma alélica o variante.

5 9. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que la proteína del receptor beta1 de IL-12 comparte al menos una homología de secuencia del 80% con un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:4.

10 10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la proteína del receptor beta1 de IL-12 comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO:4, o su forma alélica o variante.

11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la proteína del receptor beta2 de IL-12 es codificada por un ácido nucleico, cuyo ácido nucleico comprende una subsecuencia (a) y una subsecuencia (b), en el que dicha subsecuencia (a) codifica una forma soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 y la subsecuencia (b) codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig distintos que el primer dominio de dicha región constante.

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6 y 9-10, en el que la proteína del receptor beta1 de IL-12 es codificada por un ácido nucleico, cuyo ácido nucleico comprende una subsecuencia (a) y una subsecuencia (b), en el que dicha subsecuencia (a) codifica una forma soluble de la proteína del receptor beta2 de IL-12 y dicha subsecuencia (b) codifica todos los dominios de la región constante de la cadena pesada de Ig distintos que el primer dominio de dicha región constante.

13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que la proteína del receptor beta2 de IL-12 es soluble.

14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6 y 9-10, en el que la proteína del receptor beta1 de IL-12 es soluble.

15. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el complejo es soluble.

16. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 6-15, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

17. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el anticuerpo es purificado.

Fig. 1

10	20	30	40	50	60
TGCAGAGAAC	AGAGAAAGGA	CATCTGCGAG	GAAAGTTCCC	TGATGGCTGT	CAACAAAGTG
70	80	90	100	110	120
CCACGTCTCT	ATGGCTGTGT	ACGCTGAGCA	CACGATTTTA	TCGCGCCTAT	CATATCTTGG
130	140	150	160	170	180
TGCATAAACG	CACCTCACCT	CGGTCAACCC	TTGCTCCGTC	TTATGAGACA	GGCTTTATTA
190	200	210	220	230	240
TCCGCATTTT	ATATGAGGGG	AATCTGACGG	TGGAGAGAGA	ATTATCTTGC	TCAAGGCGAC
250	260	270	280	290	300
ACAGCAGAGC	CCACAGGTGG	CAGAATCCCA	CCCGAGCCCG	CTTCGACCCG	CGGGGTGGAA
310	320	330	340	350	360
ACCACGGGCG	CCCGCCCGGC	TGCGCTTCCA	GAGCTGAACT	GAGAAGCGAG	TCCTCTCCGC
370	380	390	400	410	420
CCTGCGGCCA	CCGCCAGCC	CCGACCCCG	CCCCGGCCCG	ATCCTCACTC	GGCGCCAGCT
430	440	450	460	470	480
CCCCGCGCCC	ACCCCGGAGT	TGGTGGCGCA	GAGGCGGGAG	GCGGAGGCGG	GAGGGCGGGC
490	500	510	520	530	540
GCTGGCACC	GGAACGCCCC	AGCGCCGGCA	GAGAGCGCGG	AGAGCGCGAC	ACGTGCGGCC
550	560	570	580	590	600
CAGAGCACC	GGGCCACCCG	GTCCCCGCAG	GCCCCGGACC	GCGCCCCGCTG	GCAGGCGACA
610	620	630	640	650	660
CGTGGAAGAA	TACGGAGTTC	TATACCAGAG	TTGATTGTTG	<u>ATGGCACATA</u>	CTTTTAGAGG
670	680	690	700	710	720
ATGCTCATTG	GCATTTATGT	TTATAATCAC	GTGGCTGTTG	ATTAAAGCAA	AAATAGATGC
730	740	750	760	770	780
GTGCAAGAGA	GGCGATGTGA	CTGTGAAGCC	TTCCCATGTA	ATTTTACTTG	GATCCACTGT
790	800	810	820	830	840
CAATATTACA	TGCTCTTTGA	AGCCCAGACA	AGGCTGCTTT	CACTATTCCA	GACGTAACAA
850	860	870	880	890	900
GTTAATCCTG	TACAAGTTTG	ACAGAAGAAT	CAATTTTCAC	CATGGCCACT	CCCTCAATTC
910	920	930	940	950	960
TCAAGTCACA	GGTCTTCCCC	TTGGTACAAC	CTTGTTTGTC	TGCAAACCTGG	CCTGTATCAA
970	980	990	1000	1010	1020
TAGTGATGAA	ATTCAAATAT	GTGGAGCAGA	GATCTTCGTT	GGTGTGCTC	CAGAACAGCC

Fig. 1 CONT

1030	1040	1050	1060	1070	1080
TCAAAATTTA	TCCTGCATAC	AGAAGGGAGA	ACAGGGGACT	GTGGCCTGCA	CCTGGGAAAG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AGGACGAGAC	ACCCACTTAT	ACACTGAGTA	TACTCTACAG	CTAAGTGGAC	CAAAAAATTT
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AACCTGGCAG	AAGCAATGTA	AAGACATTTA	TTGTGACTAT	TTGGACTTTG	GAATCAACCT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CACCCCTGAA	TCACCTGAAT	CCAATTTTAC	AGCCAAGGTT	ACTGCTGTCA	ATAGTCTTGG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
AAGCTCCTCT	TCACTTCCAT	CCACATTCAC	ATTCTTGGAC	ATAGTGAGGC	CTCTTCCTCC
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GTGGGACATT	AGAATCAAAT	TTCAAAAGGC	TTCCGTGAGC	AGATGTACCC	TTTATTGGAG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AGATGAGGGA	CTGGTACTGC	TTAATCGACT	CAGATATCGG	CCCAGTAACA	GCAGGCTCTG
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GAATATGGTT	AATGTTACAA	AGGCCAAAGG	AAGACATGAT	TTGCTGGATC	TGAAACCATT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
TACAGAATAT	GAATTCAGA	TTTCTCTTAA	GCTACATCTT	TATAAGGGAA	GTTGGAGTGA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
TTGGAGTGAA	TCATTGAGAG	CACAAACACC	AGAAGAAGAG	CCTACTGGGA	TGTTAGATGT
1630	1640	1650	1660	1670	1680
CTGGTACATG	AAACGGCACA	TTGACTACAG	TAGACAACAG	ATTTCTCTTT	TCTGGAAGAA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TCTGAGTGTC	TCAGAGGCAA	GAGGAAAAAT	TCTCCACTAT	CAGGTGACCT	TGCAGGAGCT
1750	1760	1770	1780	1790	1800
GACAGGAGGG	AAAGCCATGA	CACAGAACAT	CACAGGACAC	ACCTCCTGGA	CCACAGTCAT
1810	1820	1830	1840	1850	1860
TCCTAGAACC	GGAAATTGGG	CTGTGGCTGT	GTCTGCAGCA	AATTCAAAAG	GCAGTTCTCT
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GCCCACTCGT	ATTAACATAA	TGAACCTGTG	TGAGGCAGGG	TTGCTGGCTC	CTCGCCAGGT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
CTCTGCAAAC	TCAGAGGGCA	TGGACAACAT	TCTGGTGAAT	TGGCAGCCTC	CCAGGAAAGA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
TCCCTCTGCT	GTTCAGGAGT	ACGTGGTGGA	ATGGAGAGAG	CTCCATCCAG	GGGGTGACAC

Fig. 1 CONT

2050	2060	2070	2080	2090	2100
ACAGGTCCCT	CTAA A CTGGC	TACGGAGTCG	ACCCTACAAT	GTGTCTGCTC	TGATTTCAGA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GAACATAAAA	TCCTACATCT	GTTATGAAAT	CCGTGTGTAT	GCACTCTCAG	GGGATCAAGG
2170	2180	2190	2200	2210	2220
AGGATGCAGC	TCCATCCTGG	GTA A CTCTAA	GCACAAAGCA	CCACTGAGTG	GCCCCACAT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
TAATGCCATC	ACAGAGGAAA	AGGGGAGCAT	TTTAATTTCA	TGGAACAGCA	TTCCAGTCCA
2290	2300	2310	2320	2330	2340
GGAGCAAATG	GGCTGCCTCC	TCCATTATAG	GATATACTGG	AAGGAACGGG	ACTCCA A CTC
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CCAGCCTCAG	CTCTGTGAAA	TTCCCTACAG	AGTCTCCCAA	AATTCACATC	CAATAAACAG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
CCTGCAGCCC	CGAGTGACAT	ATGTCCTGTG	GATGACAGCT	CTGACAGCTG	CTGGTGA A AAG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
TTCCCACGGA	AATGAGAGGG	AATTTTGTCT	GCAAGGTAAA	GCCAATTGGA	TGGCGTTTGT
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GGCACCAAGC	ATTTGCATTG	CTATCATCAT	GGTGGGCATT	TTCTCAACGC	ATTACTTCCA
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GCAAAAGGTG	TTTGTCTCC	TAGCAGCCCT	CAGACCTCAG	TGGTGTAGCA	GAGAAATTCC
2650	2660	2670	2680	2690	2700
AGATCCAGCA	AATAGCACTT	GCGCTAAGAA	ATATCCCATT	GCAGAGGAGA	AGACACAGCT
2710	2720	2730	2740	2750	2760
GCCCTTGGAC	AGGCTCCTGA	TAGACTGGCC	CACGCCTGAA	GATCCTGAAC	CGCTGGTCAT
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CAGTGAAGTC	CTTCATCAAG	TGACCCCAGT	TTTCAGACAT	CCCCCCTGCT	CCAACTGGCC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
ACAAAGGGAA	AAAGGAATCC	AAGGTCATCA	GGCCTCTGAG	AAAGACATGA	TGCACAGTGC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
CTCAAGCCCA	CCACCTCCAA	GAGCTCTCCA	AGCTGAGAGC	AGACAACTGG	TGGATCTGTA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CAAGGTGCTG	GAGAGCAGGG	GCTCCGACCC	AAAGCCAGAA	AACCCAGCCT	GTCCCTGGAC
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GGTGCTCCCA	GCAGGTGACC	TTCCCACCCA	TGATGGCTAC	TTACCCTCCA	ACATAGATGA

Fig. 1 CONT

3070	3080	3090	3100	3110	3120
CCTCCCCCTCA	CATGAGGCAC	CTCTCGCTGA	CTCTCTGGAA	GAAGTGGAGC	CTCAGCACAT
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CTCCCTTTCT	GTTTTCCCCCT	CAAGTTCTCT	TCACCCACTC	ACCTTCTCCT	GTGGTGATAA
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GCTGACTCTG	GATCAGTTAA	AGATGAGGTG	TGACTCCCTC	ATGCTCTGAG	TGGTGAGGCT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TCAAGCCTTA	AAGTCAGTGT	GCCCTCAACC	AGCACAGCCT	GCCCCAATTC	CCCCAGCCCC
3310	3320	3330	3340	3350	3360
TGCTCCAGCA	GCTGTCATCT	CTGGGTGCCA	CCATCGGTCT	GGCTGCAGCT	AGAGGACAGG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
CAAGCCAGCT	CTGGGGGAGT	CTTAGGAACT	GGGAGTTGGT	CTTCACTCAG	ATGCCTCATC
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TTGCCTTTCC	CAGGGCCTTA	AAATTACATC	CTTCACTGTG	TGGACCTAGA	GACTCCAACCT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TGAATTCCTA	GTAACCTTTCT	TGGTATGCTG	GCCAGAAAGG	GAAATGAGGA	GGAGAGTAGA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
AACCACAGCT	CTTAGTAGTA	ATGGCATACA	GTCTAGAGGA	CCATTCATGC	AATGACTATT
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TCTAAAGCAC	CTGCTACACA	GCAGGCTGTA	CACAGCAGAT	CAGTACTGTT	CAACAGAACT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
TCCTGAGATG	ATGGAAATGT	TCTACCTCTG	CACTCACTGT	CCAGTACATT	AGACACTAGG
3730	3740	3750	3760	3770	3780
CACATTGGCT	GTTAATCACT	TGGAATGTGT	TTAGCTTGAC	TGAGGAATTA	AATTTTGATT
3790	3800	3810	3820	3830	3840
GTAAATTTAA	ATCGCCACAC	ATGGCTAGTG	GCTACTGTAT	TGGAGTGCAC	AGCTCTAGAT
3850	3860	3870	3880	3890	3900
GGCTCCTAGA	TTATTGAGAG	CCTCCAAAAC	AAATCAACCT	AGTTCTATAG	ATGAAGACAT
3910	3920	3930	3940	3950	3960
AAAAGACACT	GGTAAACACC	AATGTAAAAG	GGCCCCCAAG	GTGGTCATGA	CTGGTCTCAT
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TTGCAGAAGT	CTAAGAATGT	ACCTTTTTCT	GGCCGGGCGT	GGTAGCTCAT	GCCTGTAATC
4030	4040				
CCAGCACTTT	GGGAGGCTGA				

Fig. 2

1 MAHTFERGCSL AFMFIITWLL IKAKIDACKR GDVTVKPSHV ILLGSTVNIT
 51 CSLKPRQGCF HYSRRNKLIL YKFDRRINFH HGHSLSNSQVT GLPLGTTLFV
 101 CKLACINSDE IQICGAEIFV GVAPEQPQNL SCIQKGEQGT VACTWERGRD
 151 THLYTEYTLQ LSGPKNLTWQ KQCKDIYCDY LDFGINLTPE SPESNFTAKV
 201 TAVNSLGSSS SLPSTFTFLD IVRPLPPWDI RIKFQKASVS RCTLYWRDEG
 251 LVLLNRLRYR PSNSRLWNMV NVTKAKGRHD LLDLKPFTFY EFQISSKLHL
 301 YKGSWSWSE SLRAQTPEEE PTGMLDVWYM KRHIDYSRQQ ISLFWKNLSV
 351 SEARGKILHY QVTLQELTGG KAMTONITGH TSWTTVIPRT GNWAVAVSAA
 401 NSKGSSLPTR INIMNLCEAG LLAPRQVSAN SEGMDNILVT WQPPRKDPSA
 451 VQEYVVEWRE LHPGGDTQVP LNWLRSPYN VSALISENIK SYICYEIRVY
 501 ALSGDQGGCS SILGNSKHKA PLSGPHINAI TEEKGSILIS WNSIPVQEQM
 551 GCLLHYRIYW KERDSNSQPQ LCEIPYRVSQ NSHPINSLQP RVTYVLWMTA
 601 LTAAGESSHG NEREFCLQ GK ANWMAFVAPS ICTAIIMVGI FSTHYFQQKV
 651 FVLLAALRPQ WCSREIPDPA NSTCAKKYPI AEKTLQLPLD RLLIDWPTPE
 701 DPEPLVISEV LHQVTPVFRH PPCSNWPQRE KGIQGHQASE KDMHSAASP
 751 PPPRALQAES RQLVDLYKVL ESRGSDPKPE NPACPWTVLP AGDLPTHGKY
 801 LPSNIDDLPS HEAPLADSLE ELEPQHISLS VFPSSSLHPL TFSCGDKLTL
 851 DQLKMRCDSL ML

Fig. 3

```

      10      20      30      40      50      60      70
GGTGGCTGAA CCTCGCAGGT GGCAGAGAGG CTCCCCTGGG GCTGTGGGGC TCTACGTGGA TCCGATGGAG
      80      90     100     110     120     130     140
CCGCTGGTGA CCTGGGTGGT CCCCCTCCTC TTCCTCTTCC TGCTGTCCAG GCAGGGCGCT GCCTGCAGAA
      150     160     170     180     190     200     210
CCAGTGAGTG CTGTTTTTCTG GACCCGCCAT ATCCGGATGC AGACTCAGGC TCGGCCTCGG GCCCTAGGGA
      220     230     240     250     260     270     280
CCTGAGATGC TATCGGATAT CCAGTGATCG TTACGAGTGC TCCTGGCAGT ATGAGGGTCC CACAGCTGGG
      290     300     310     320     330     340     350
GTCAGCCACT TCCTGCGGTG TTGCCTTAGC TCCGGGCGCT GCTGCTACTT CGCCGCCGGC TCAGCCACCA
      360     370     380     390     400     410     420
GGCTGCAGTT CTCCGACCAG GCTGGGGTGT CTGTGCTGTA CACTGTCACA CTCTGGGTGG AATCCTGGGC
      430     440     450     460     470     480     490
CAGGAACCAG ACAGAGAAGT CTCCTGAGGT GACCCTGCAG CTCTACAACT CAGTTAAATA TGAGCCTCCT
      500     510     520     530     540     550     560
CTGGGAGACA TCAAGGTGTC CAAGTTGGCC GGGCAGCTGC GTATGGAGTG GGAGACCCCG GATAACCAGG
      570     580     590     600     610     620     630
TTGGTGCTGA GGTGCAGTTC CGGCACCGGA CACCCAGCAG CCCATGGAAG TTGGGCGACT GCGGACCTCA
      640     650     660     670     680     690     700
GGATGATGAT ACTGAGTCCT GCCTCTGCCC CCTGGAGATG AATGTGGCCC AGGAATTCCA GCTCCGACGA
      710     720     730     740     750     760     770
CGGCAGCTGG GGAGCCAAGG AAGTTCCTGG AGCAAGTGGA GCAGCCCCGT GTGCGTTCCC CCTGAAAACC
      780     790     800     810     820     830     840
CCCCACAGCC TCAGGTGAGA TTCTCGGTGG AGCAGCTGGG CCAGGATGGG AGGAGGCGGC TGACCCTGAA
      850     860     870     880     890     900     910
AGAGCAGCCA ACCCAGCTGG AGCTTCAGA AGGCTGTCAA GGGCTGGCGC CTGGCACGGA GGTCACTTAC
      920     930     940     950     960     970     980
CGACTACAGC TCCACATGCT GTCTTGCCCG TGTAAGGCCA AGGCCACCAG GACCCTGCAC CTGGGGAAGA
      990    1000    1010    1020    1030    1040    1050
TGCCCTATCT CTCGGGTGCT GCCTACAACG TGGCTGTCTAT CTCCTCGAAC CAATTGGTTC CTGGCCTGAA
    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
CCAGACGTGG CACATTCTCT CCGACACCCA CACAGAACCA GTGGCTCTGA ATATCAGCGT CGGAACCAAC

```

Fig. 3 CONT

1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
GGGACCACCA	TGTATTGGCC	AGCCCCGGCT	CAGAGCATGA	CGTATTGCAT	TGAATGGCAG	CCTGTGGGCC
1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
AGGACGGGGG	CCTTGCCACC	TGCAGCCTGA	CTGCGCCGCA	AGACCCGGAT	CCGGCTGGAA	TGGCAACCTA
1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
CAGCTGGAGT	CGAGAGTCTG	GGGCAATGGG	GCAGGAAAAG	TGTTACTACA	TTACCATCTT	TGCCTCTGCG
1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
CACCCCGAGA	AGCTCACCTT	GTGGTCTACG	GTCCTGTCCA	CCTACCACTT	TGGGGGCAAT	GCCTCAGCAG
1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
CTGGGACACC	GCACCACGTC	TCGGTGAAGA	ATCATAGCTT	GGACTCTGTG	TCTGTGGACT	GGGCACCATC
1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
CCTGCTGAGC	ACCTGTCCCG	GCGTCCTAAA	GGAGTATGTT	GTCCGCTGCC	GAGATGAAGA	CAGCAAACA#
1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
GTGTCAGAGC	ATCCCGTGCA	GCCCCACAGAG	ACCCAAGTTA	CCCTCAGTGG	CCTGCGGGCT	GGTGTAGCCT
1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
ACACGGTGCA	GGTGCGAGCA	GACACAGCGT	GGCTGAGGGG	TGTCTGGAGC	CAGCCCCAGC	GCTTCAGCAT
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
CGAAGTGCAG	GTTTCTGATT	GGCTCATCTT	CTTCGCCTCC	CTGGGGAGCT	TCCTGAGCAT	CCTTCTCGTG
1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
GGCGTCCTTG	GCTACCTTGG	CCTGAACAGG	GCCGCACGGC	ACCTGTGCCC	GCCGCTGCCC	ACACCCGTGTG
1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890
CCAGCTCCGC	CATTGAGTTC	CCTGGAGGGA	AGGAGACTTG	GCAGTGGATC	AACCCAGTGG	ACTTCCAGGA
1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960
AGAGGCATCC	CTGCAGGAGG	CCCTGGTGGT	AGAGATGTCC	TGGGACAAAG	GCGAGAGGAC	TGAGCCTCTC
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
GAGAAGACAG	AGCTACCTGA	GGGTGCCCCCT	GAGCTGGCCC	TGGATACAGA	GTTGTCCTTG	GAGGATGGAG
2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
ACAGGTGCAA	GGCCAAGATG	<u>TGATCGTTGA</u>	GGCTCAGAGA	GGGTGAGTGA	CTCGCCCCGAG	GCTACGTAGC

```

10      20      30      40      50      60      70
MEPLVTWVVP LLFLFLLSRO GAACRTSECC FQPPYPDAD SGSASGPRDL RCYRISSDRY ECSWQYEGPT

80      90      100     110     120     130     140
AGVSHFLRCC LSSGRCCYFA AGSATRLQFS DQAGVSVLYT VTLWVESWAR NQTEKSPEVT LQLYNSVKYE

150     160     170     180     190     200     210
PPLGDIKVSX LAGQLRMEWE TPDNQVGAEV QFRHRTFPSSP WKLGDCGPQD DDTESCLCPL EMNVAQEFQL

220     230     240     250     260     270     280
RRRQLGSQGS SWSKWSSPVC VPPENPPQPQ VRFSVEQLGQ DGRRLTLKE OPTQLELPEG CQGLAPGTEV

290     300     310     320     330     340     350
TYRLQLHMLS CPCKAKATRT LHLGKMPYLS GAAYNVAVIS SNQFGPGLNQ TWHIPADTHT EPVALNISVG

360     370     380     390     400     410     420
TNGTMYWPA RAQSMTYCIE WQPVGQDGLL ATCSLTAPQD PDPAGMATYS WSRESGAMGQ EKCYVITIFA
---

430     440     450     460     470     480     4
SAHPEKLTW STVLSTYHFG GNASAACTPH HVSVKNHSLD SVSVDWAPSL LSTCPGVLKE YVVRCRDED$

500     510     520     530     540     550     560
KQVSEHPVQP TETQVTLGL RAGVAYTVQV RADTAWLRGV WSQPQRFSE VQVSDWLIFF ASLGSFLSIL
-----

570     580     590     600     610     620     630
LVGVLYLGL NRAARHLCP LPTECASSAI EFPGKETWQ WINPVDEQEE ASLQEALYVE MSWDKGERTE
-----

640     650     660
PLEKTELPEG APELALDTEL SLEDGDRCKA KH

```

Fig. 4

Fig. 5

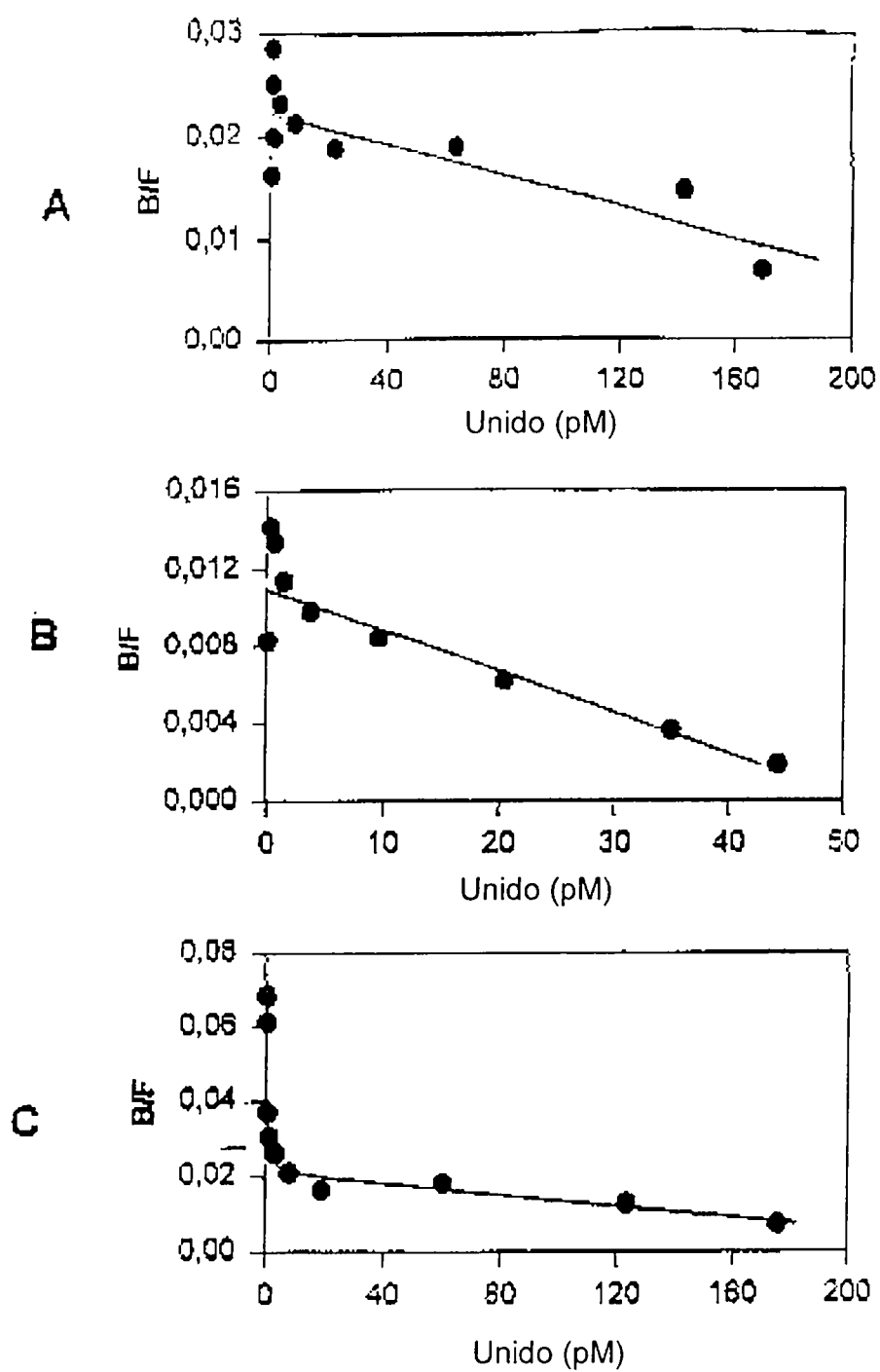
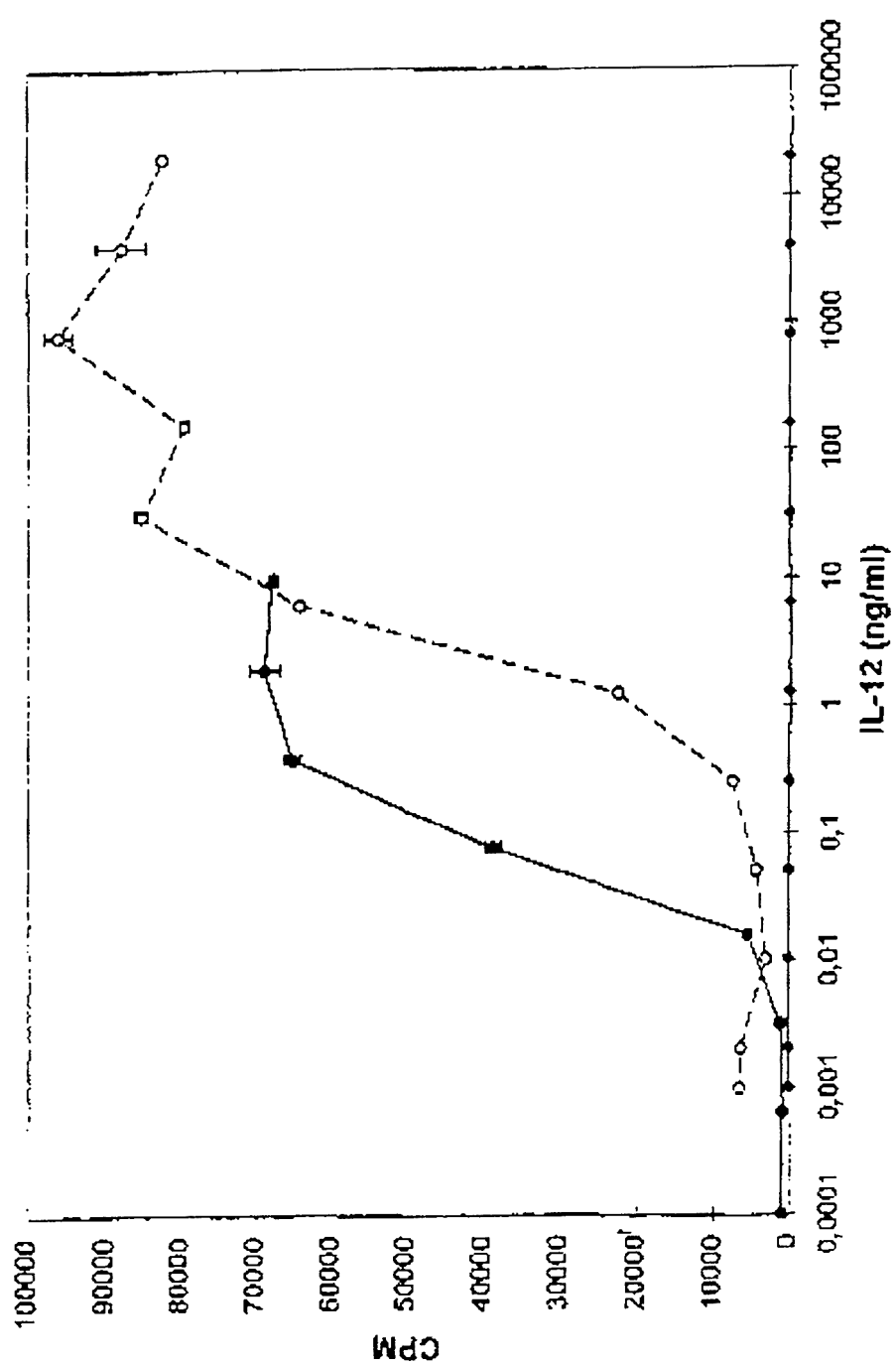


Fig. 6



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: HOFFMANN-LA ROCHE AG

(B) CALLE: Grenzacherstrasse 124

(C) CIUDAD: Basle

(D) ESTADO: BS

(E) PAÍS: Switzerland

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4002

(G) TELÉFONO: 061-688 51 08

(H) TELEFAX: 061-688 13 95

(I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Receptores para Interleuquina-12

(ii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4

(iv) TIPO DE LECTURA DE ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Floppy disk

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Publicacion PatentIn #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 4040 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: secuencia codificante

(B) LOCALIZACIÓN: 641..3226

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

ES 2 305 024 T3

	TGCAGAGAAC AGAGAAAGGA CATCTGCGAG GAAAGTTCCT TGATGGCTGT CAACAAAGTG	60
5	CCACGTCTCT ATGGCTGTGT ACGCTGAGCA CACGATTTTA TCGCGCCTAT CATATCTTGG	120
	TGCATAAACG CACCTCACCT CGGTCAACCC TTGCTCCGTC TTATGAGACA GGCTTTATTA	180
10	TCCGCATTTT ATATGAGGGG AATCTGACGG TGGAGAGAGA ATTATCTTGC TCAAGGCGAC	240
	ACAGCAGAGC CCACAGGTGG CAGAATCCCA CCCGAGCCCG CTTCGACCCG CGGGGTGGAA	300
15	ACCACGGGCG CCCGCCCGGC TGCCTTCCA GAGCTGAACT GAGAAGCGAG TCCTCTCCGC	360
	CCTGCGGCCA CCGCCAGCC CCGACCCCG CCCCGGCCCG ATCCTCACTC GCCGCCAGCT	420
20	CCCCGCGCCC ACCCCGGAGT TGGTGGCGCA GAGGCGGGAG GCGGAGGCGG GAGGGCGGGC	480
	GCTGGCACCG GGAACGCCCC AGCGCCGGCA GAGAGCGCGG AGAGCGCGAC ACGTGC GGCC	540
25	CAGAGCACCG GGGCCACCCG GTCCCCGAG GCCCGGGACC GCGCCCGCTG GCAGGCGACA	600
	CGTGAAGAA TACGGAGTTC TATACCAGAG TTGATTGTTG ATG GCA CAT ACT TTT	655
30		Met Ala His Thr Phe
		1 5
	AGA GGA TGC TCA TTG GCA TTT ATG TTT ATA ATC ACG TGG CTG TTG ATT	703
35	Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile Thr Trp Leu Leu Ile	
	10 15 20	
	AAA GCA AAA ATA GAT GCG TGC AAG AGA GGC GAT GTG ACT GTG AAG CCT	751
40	Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp Val Thr Val Lys Pro	
	25 30 35	
	TCC CAT GTA ATT TTA CTT GGA TCC ACT GTC AAT ATT ACA TGC TCT TTG	799
45	Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn Ile Thr Cys Ser Leu	
	40 45 50	
	AAG CCC AGA CAA GGC TGC TTT CAC TAT TCC AGA CGT AAC AAG TTA ATC	847
50	Lys Pro Arg Gln Gly Cys Phe His Tyr Ser Arg Arg Asn Lys Leu Ile	
	55 60 65	
	CTG TAC AAG TTT GAC AGA AGA ATC AAT TTT CAC CAT GGC CAC TCC CTC	895
55	Leu Tyr Lys Phe Asp Arg Arg Ile Asn Phe His His Gly His Ser Leu	
	70 75 80 85	
	AAT TCT CAA GTC ACA GGT CTT CCC CTT GGT ACA ACC TTG TTT GTC TGC	943
60	Asn Ser Gln Val Thr Gly Leu Pro Leu Gly Thr Thr Leu Phe Val Cys	
	90 95 100	
	AAA CTG GCC TGT ATC AAT AGT GAT GAA ATT CAA ATA TGT GGA GCA GAG	991
65	Lys Leu Ala Cys Ile Asn Ser Asp Glu Ile Gln Ile Cys Gly Ala Glu	
	105 110 115	

ES 2 305 024 T3

5	ATC TTC GTT GGT GTT GCT CCA GAA CAG CCT CAA AAT TTA TCC TGC ATA Ile Phe Val Gly Val Ala Pro Glu Gln Pro Gln Asn Leu Ser Cys Ile	1039
	120 125 130	
10	CAG AAG GGA GAA CAG GGG ACT GTG GCC TGC ACC TGG GAA AGA GGA CGA Gln Lys Gly Glu Gln Gly Thr Val Ala Cys Thr Trp Glu Arg Gly Arg	1087
	135 140 145	
15	GAC ACC CAC TTA TAC ACT GAG TAT ACT CTA CAG CTA AGT GGA CCA AAA Asp Thr His Leu Tyr Thr Glu Tyr Thr Leu Gln Leu Ser Gly Pro Lys	1135
	150 155 160 165	
20	AAT TTA ACC TGG CAG AAG CAA TGT AAA GAC ATT TAT TGT GAC TAT TTG Asn Leu Thr Trp Gln Lys Gln Cys Lys Asp Ile Tyr Cys Asp Tyr Leu	1183
25	170 175 180	
30	GAC TTT GGA ATC AAC CTC ACC CCT GAA TCA CCT GAA TCC AAT TTC ACA Asp Phe Gly Ile Asn Leu Thr Pro Glu Ser Pro Glu Ser Asn Phe Thr	1231
	185 190 195	
35	GCC AAG GTT ACT GCT GTC AAT AGT CTT GGA AGC TCC TCT TCA CTT CCA Ala Lys Val Thr Ala Val Asn Ser Leu Gly Ser Ser Ser Ser Leu Pro	1279
	200 205 210	
40	TCC ACA TTC ACA TTC TTG GAC ATA GTG AGG CCT CTT CCT CCG TGG GAC Ser Thr Phe Thr Phe Leu Asp Ile Val Arg Pro Leu Pro Pro Trp Asp	1327
	215 220 225	
45	ATT AGA ATC AAA TTT CAA AAG GCT TCC GTG AGC AGA TGT ACC CTT TAT Ile Arg Ile Lys Phe Gln Lys Ala Ser Val Ser Arg Cys Thr Leu Tyr	1375
50	230 235 240 245	
55	TGG AGA GAT GAG GGA CTG GTA CTG CTT AAT CGA CTC AGA TAT CGG CCC Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg Leu Arg Tyr Arg Pro	1423

ES 2 305 024 T3

	250	255	260	
5	AGT AAC AGC AGG CTC TGG AAT ATG GTT AAT GTT ACA AAG GCC AAA GGA	1471		
	Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val Thr Lys Ala Lys Gly			
	265	270	275	
10	AGA CAT GAT TTG CTG GAT CTG AAA CCA TTT ACA GAA TAT GAA TTT CAG	1519		
	Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Glu Phe Gln			
15	280	285	290	
	ATT TCC TCT AAG CTA CAT CTT TAT AAG GGA AGT TGG AGT GAT TGG AGT	1567		
20	Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser Trp Ser Asp Trp Ser			
	295	300	305	
25	GAA TCA TTG AGA GCA CAA ACA CCA GAA GAA GAG CCT ACT GGG ATG TTA	1615		
	Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu Pro Thr Gly Met Leu			
	310	315	320	325
30	GAT GTC TGG TAC ATG AAA CGG CAC ATT GAC TAC AGT AGA CAA CAG ATT	1663		
	Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr Ser Arg Gln Gln Ile			
	330	335	340	
35	TCT CTT TTC TGG AAG AAT CTG AGT GTC TCA GAG GCA AGA GGA AAA ATT	1711		
	Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu Ala Arg Gly Lys Ile			
40	345	350	355	
	CTC CAC TAT CAG GTG ACC TTG CAG GAG CTG ACA GGA GGG AAA GCC ATG	1759		
45	Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr Gly Gly Lys Ala Met			
	360	365	370	
50	ACA CAG AAC ATC ACA GGA CAC ACC TCC TGG ACC ACA GTC ATT CCT AGA	1807		
	Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr Thr Val Ile Pro Arg			
	375	380	385	

ES 2 305 024 T3

5	ACC GGA AAT TGG GCT GTG GCT GTG TCT GCA GCA AAT TCA AAA GGC AGT Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala Asn Ser Lys Gly Ser 390 395 400 405	1855
10	TCT CTG CCC ACT CGT ATT AAC ATA ATG AAC CTG TGT GAG GCA GGG TTG Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu Cys Glu Ala Gly Leu 410 415 420	1903
15	CTG GCT CCT CGC CAG GTC TCT GCA AAC TCA GAG GGC ATG GAC AAC ATT Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu Gly Met Asp Asn Ile 425 430 435	1951
20	CTG GTG ACT TGG CAG CCT CCC AGG AAA GAT CCC TCT GCT GTT CAG GAG Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro Ser Ala Val Gln Glu 440 445 450	1999
25	TAC GTG GTG GAA TGG AGA GAG CTC CAT CCA GGG GGT GAC ACA CAG GTC Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly Gly Asp Thr Gln Val 455 460 465	2047
30	CCT CTA AAC TGG CTA CGG AGT CGA CCC TAC AAT GTG TCT GCT CTG ATT Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn Val Ser Ala Leu Ile 470 475 480 485	2095
35	TCA GAG AAC ATA AAA TCC TAC ATC TGT TAT GAA ATC CGT GTG TAT GCA Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu Ile Arg Val Tyr Ala 490 495 500	2143
40	CTC TCA GGG GAT CAA GGA GGA TGC AGC TCC ATC CTG GGT AAC TCT AAG Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile Leu Gly Asn Ser Lys 505 510 515	2191
45	CAC AAA GCA CCA CTG AGT GGC CCC CAC ATT AAT GCC ATC ACA GAG GAA His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn Ala Ile Thr Glu Glu	2239

ES 2 305 024 T3

	520	525	530	
5	AAG GGG AGC ATT TTA ATT TCA TGG AAC AGC ATT CCA GTC CAG GAG CAA			2287
	Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile Pro Val Gln Glu Gln			
	535	540	545	
10	ATG GGC TGC CTC CTC CAT TAT AGG ATA TAC TGG AAG GAA CGG GAC TCC			2335
	Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp Lys Glu Arg Asp Ser			
15	550	555	560	565
	AAC TCC CAG CCT CAG CTC TGT GAA ATT CCC TAC AGA GTC TCC CAA AAT			2383
20	Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr Arg Val Ser Gln Asn			
	570	575	580	
25	TCA CAT CCA ATA AAC AGC CTG CAG CCC CGA GTG ACA TAT GTC CTG TGG			2431
	Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val Thr Tyr Val Leu Trp			
	585	590	595	
30	ATG ACA GCT CTG ACA GCT GCT GGT GAA AGT TCC CAC GGA AAT GAG AGG			2479
	Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser His Gly Asn Glu Arg			
	600	605	610	
35	GAA TTT TGT CTG CAA GGT AAA GCC AAT TGG ATG GCG TTT GTG GCA CCA			2527
	Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met Ala Phe Val Ala Pro			
40	615	620	625	
45	AGC ATT TGC ATT GCT ATC ATC ATG GTG GGC ATT TTC TCA ACG CAT TAC			2575
	Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile Phe Ser Thr His Tyr			
	630	635	640	645
50	TTC CAG CAA AAG GTG TTT GTT CTC CTA GCA GCC CTC AGA CCT CAG TGG			2623
	Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala Leu Arg Pro Gln Trp			
	650	655	660	

ES 2 305 024 T3

5	TGT AGC AGA GAA ATT CCA GAT CCA GCA AAT AGC ACT TGC GCT AAG AAA Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser Thr Cys Ala Lys Lys	2671
	665 670 675	
10	TAT CCC ATT GCA GAG GAG AAG ACA CAG CTG CCC TTG GAC AGG CTC CTG Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro Leu Asp Arg Leu Leu	2719
	680 685 690	
15	ATA GAC TGG CCC ACG CCT GAA GAT CCT GAA CCG CTG GTC ATC AGT GAA Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro Leu Val Ile Ser Glu	2767
	695 700 705	
20	GTC CTT CAT CAA GTG ACC CCA GTT TTC AGA CAT CCC CCC TGC TCC AAC Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His Pro Pro Cys Ser Asn	2815
25	710 715 720 725	
30	TGG CCA CAA AGG GAA AAA GGA ATC CAA GGT CAT CAG GCC TCT GAG AAA Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His Gln Ala Ser Glu Lys	2863
	730 735 740	
35	GAC ATG ATG CAC AGT GCC TCA AGC CCA CCA CCT CCA AGA GCT CTC CAA Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Gln	2911
	745 750 755	
40	GCT GAG AGC AGA CAA CTG GTG GAT CTG TAC AAG GTG CTG GAG AGC AGG Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys Val Leu Glu Ser Arg	2959
	760 765 770	
45	GGC TCC GAC CCA AAG CCA GAA AAC CCA GCC TGT CCC TGG ACG GTG CTC Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys Pro Trp Thr Val Leu	3007
50	775 780 785	
55	CCA GCA GGT GAC CTT CCC ACC CAT GAT GGC TAC TTA CCC TCC AAC ATA Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile	3055

ES 2 305 024 T3

	790	795	800	805	
5	GAT GAC CTC CCC TCA CAT GAG GCA CCT CTC GCT GAC TCT CTG GAA GAA				3103
	Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu				
		810	815	820	
10	CTG GAG CCT CAG CAC ATC TCC CTT TCT GTT TTC CCC TCA AGT TCT CTT				3151
	Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu				
		825	830	835	
15					
	CAC CCA CTC ACC TTC TCC TGT GGT GAT AAG CTG ACT CTG GAT CAG TTA				3199
20	His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu				
		840	845	850	
25	AAG ATG AGG TGT GAC TCC CTC ATG CTC TGAGTGGTGA GGCTTCAAGC				3246
	Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu				
		855	860		
30	CTTAAAGTCA GTGTGCCCTC AACCAGCACA GCCTGCCCCA ATTCCCCCAG CCCCTGCTCC				3306
35	AGCAGCTGTC ATCTCTGGGT GCCACCATCG GTCTGGCTGC AGCTAGAGGA CAGGCAAGCC				3366
	AGCTCTGGGG GAGTCTTAGG AACTGGGAGT TGGTCTTCAC TCAGATGCCT CATCTTGCCT				3426
40	TTCCCAGGGC CTTAAAATTA CATCCTTCAC TGTGTGGACC TAGAGACTCC AACTTGAATT				3486
	CCTAGTAACT TTCTTGGTAT GCTGGCCAGA AAGGGAAATG AGGAGGAGAG TAGAAACCAC				3546
45					
	AGCTCTTAGT AGTAATGGCA TACAGTCTAG AGGACCATTG ATGCAATGAC TATTTCTAAA				3606
50	GCACCTGCTA CACAGCAGGC TGTACACAGC AGATCAGTAC TGTTCACAG AACTTCCTGA				3666
	GATGATGGAA ATGTTCTACC TCTGCACTCA CTGTCCAGTA CATTAGACAC TAGGCACATT				3726
55					
60					
65					

ES 2 305 024 T3

GGCTGTAAAT CACTTGGAAT GTGTTTAGCT TGAAGGAGGA ATTAAATTTT GATTGTAAAT 3786

5 TTAAATCGCC ACACATGGCT AGTGGCTACT GTATTGGAGT GCACAGCTCT AGATGGCTCC 3846

TAGATTATTG AGAGCCTCCA AAACAAATCA ACCTAGTTCT ATAGATGAAG ACATAAAAGA 3906

10 CACTGGTAAA CACCAATGTA AAAGGGCCCC CAAGGTGGTC ATGACTGGTC TCATTTGCAG 3966

15 AAGTCTAAGA ATGTACCTTT TTCTGGCCGG GCGTGGTAGC TCATGCCTGT AATCCCAGCA 4026

CTTTGGGAGG CTGA 4040

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 862 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

35

Met Ala His Thr Phe Arg Gly Cys Ser Leu Ala Phe Met Phe Ile Ile
1 5 10 15

40

Thr Trp Leu Leu Ile Lys Ala Lys Ile Asp Ala Cys Lys Arg Gly Asp
20 25 30

45

Val Thr Val Lys Pro Ser His Val Ile Leu Leu Gly Ser Thr Val Asn
35 40 45

50

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

55

60

65

ES 2 305 024 T3

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

ES 2 305 024 T3

Arg Cys Thr Leu Tyr Trp Arg Asp Glu Gly Leu Val Leu Leu Asn Arg
245 250 255

Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val
260 265 270

Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr
275 280 285

Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser
290 295 300

Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu
305 310 315 320

Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr
325 330 335

Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu
340 345 350

Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr
355 360 365

Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr
370 375 380

Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala
385 390 395 400

Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu
405 410 415

ES 2 305 024 T3

	Cys	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Pro	Arg	Gln	Val	Ser	Ala	Asn	Ser	Glu	
5																	
	Gly	Met	Asp	Asn	Ile	Leu	Val	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Asp	Pro	
10																	
	Ser	Ala	Val	Gln	Glu	Tyr	Val	Val	Glu	Trp	Arg	Glu	Leu	His	Pro	Gly	
15																	
	Gly	Asp	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Asn	Trp	Leu	Arg	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	
20																	
	465																
25																	
	Val	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Glu	Asn	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ile	Cys	Tyr	Glu	
30																	
	Ile	Arg	Val	Tyr	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Gly	Gly	Cys	Ser	Ser	Ile	
35																	
	Leu	Gly	Asn	Ser	Lys	His	Lys	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Pro	His	Ile	Asn	
40																	
	Ala	Ile	Thr	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Ile	
45																	
	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	Met	Gly	Cys	Leu	Leu	His	Tyr	Arg	Ile	Tyr	Trp	
50																	
	Lys	Glu	Arg	Asp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Gln	Leu	Cys	Glu	Ile	Pro	Tyr	
55																	
	Arg	Val	Ser	Gln	Asn	Ser	His	Pro	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	
60																	
	Thr	Tyr	Val	Leu	Trp	Met	Thr	Ala	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Glu	Ser	Ser	

ES 2 305 024 T3

	595	600	605
5	His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met		
	610	615	620
10	Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile		
	625	630	635 640
15	Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala		
	645	650	655
20	Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser		
	660	665	670
25	Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro		
	675	680	685
30	Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro		
	690	695	700
35	Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His		
	705	710	715 720
40	Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His		
	725	730	735
45	Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro		
	740	745	750
50	Pro Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys		
	755	760	765
55	Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys		
	770	775	780
60			
65			

ES 2 305 024 T3

Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr
785 790 795 800

Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala
805 810 815

Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe
820 825 830

Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu
835 840 845

Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
850 855 860

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2104 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA a ARNm

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(G) TIPO DE CÉLULA: células T humanas

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: biblioteca 3 días PHA/pEF-BOS

(B) CLON: clon #5 del receptor de interleuquina-12 humano

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: SECUENCIA CODIFICANTE

(B) LOCALIZACIÓN: 65..2050

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

ES 2 305 024 T3

	GGTGGCTGAA CCTCGCAGGT GGCAGAGAGG CTCCCCTGGG GCTGTGGGGC TCTACGTGGA	60
5	TCCG ATG GAG CCG CTG GTG ACC TGG GTG GTC CCC CTC CTC TTC CTC TTC Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe 1 5 10 15	109
10	CTG CTG TCC AGG CAG GGC GCT GCC TGC AGA ACC AGT GAG TGC TGT TTT Leu Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe 20 25 30	157
15	CAG GAC CCG CCA TAT CCG GAT GCA GAC TCA GGC TCG GCC TCG GGC CCT Gln Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro 35 40 45	205
20	AGG GAC CTG AGA TGC TAT CGG ATA TCC AGT GAT CGT TAC GAG TGC TCC Arg Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser 50 55 60	253
25	TGG CAG TAT GAG GGT CCC ACA GCT GGG GTC AGC CAC TTC CTG CGG TGT Trp Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys 65 70 75	301
30	TGC CTT AGC TCC GGG CGC TGC TGC TAC TTC GCC GCC GGC TCA GCC ACC Cys Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr	349
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 305 024 T3

	80	85	90	95	
5	AGG CTG CAG TTC TCC GAC CAG GCT GGG GTG TCT GTG CTG TAC ACT GTC				397
	Arg Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val				
	100	105	110		
10	ACA CTC TGG GTG GAA TCC TGG GCC AGG AAC CAG ACA GAG AAG TCT CCT				445
	Thr Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro				
15	115	120	125		
20	GAG GTG ACC CTG CAG CTC TAC AAC TCA GTT AAA TAT GAG CCT CCT CTG				493
	Glu Val Thr Leu Gln Leu Tyr Asn Ser Val Lys Tyr Glu Pro Pro Leu				
	130	135	140		
25	GGA GAC ATC AAG GTG TCC AAG TTG GCC GGG CAG CTG CGT ATG GAG TGG				541
	Gly Asp Ile Lys Val Ser Lys Leu Ala Gly Gln Leu Arg Met Glu Trp				
	145	150	155		
30	GAG ACC CCG GAT AAC CAG GTT GGT GCT GAG GTG CAG TTC CGG CAC CGG				589
	Glu Thr Pro Asp Asn Gln Val Gly Ala Glu Val Gln Phe Arg His Arg				
35	160	165	170	175	
40	ACA CCC AGC AGC CCA TGG AAG TTG GGC GAC TGC GGA CCT CAG GAT GAT				637
	Thr Pro Ser Ser Pro Trp Lys Leu Gly Asp Cys Gly Pro Gln Asp Asp				
	180	185	190		
45	GAT ACT GAG TCC TGC CTC TGC CCC CTG GAG ATG AAT GTG GCC CAG GAA				685
	Asp Thr Glu Ser Cys Leu Cys Pro Leu Glu Met Asn Val Ala Gln Glu				
	195	200	205		
50	TTC CAG CTC CGA CGA CGG CAG CTG GGG AGC CAA GGA AGT TCC TGG AGC				733
	Phe Gln Leu Arg Arg Arg Gln Leu Gly Ser Gln Gly Ser Ser Trp Ser				
	210	215	220		

ES 2 305 024 T3

5	AAG TGG AGC AGC CCC GTG TGC GTT CCC CCT GAA AAC CCC CCA CAG CCT Lys Trp Ser Ser Pro Val Cys Val Pro Pro Glu Asn Pro Pro Gln Pro 225 230 235	781
10	CAG GTG AGA TTC TCG GTG GAG CAG CTG GGC CAG GAT GGG AGG AGG CGG Gln Val Arg Phe Ser Val Glu Gln Leu Gly Gln Asp Gly Arg Arg Arg 240 245 250 255	829
15	CTG ACC CTG AAA GAG CAG CCA ACC CAG CTG GAG CTT CCA GAA GGC TGT Leu Thr Leu Lys Glu Gln Pro Thr Gln Leu Glu Leu Pro Glu Gly Cys 260 265 270	877
20	CAA GGG CTG GCG CCT GGC ACG GAG GTC ACT TAC CGA CTA CAG CTC CAC Gln Gly Leu Ala Pro Gly Thr Glu Val Thr Tyr Arg Leu Gln Leu His 275 280 285	925
25	ATG CTG TCC TGC CCG TGT AAG GCC AAG GCC ACC AGG ACC CTG CAC CTG Met Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu 290 295 300	973
30	GGG AAG ATG CCC TAT CTC TCG GGT GCT GCC TAC AAC GTG GCT GTC ATC Gly Lys Met Pro Tyr Leu Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Val Ala Val Ile 305 310 315	1021
35	TCC TCG AAC CAA TTT GGT CCT GGC CTG AAC CAG ACG TGG CAC ATT CCT Ser Ser Asn Gln Phe Gly Pro Gly Leu Asn Gln Thr Trp His Ile Pro 320 325 330 335	1069
40	GCC GAC ACC CAC ACA GAA CCA GTG GCT CTG AAT ATC AGC GTC GGA ACC Ala Asp Thr His Thr Glu Pro Val Ala Leu Asn Ile Ser Val Gly Thr 340 345 350	1117
45	AAC GGG ACC ACC ATG TAT TGG CCA GCC CGG GCT CAG AGC ATG ACG TAT Asn Gly Thr Thr Met Tyr Trp Pro Ala Arg Ala Gln Ser Met Thr Tyr 1165	

ES 2 305 024 T3

	355	360	365	
5	TGC ATT GAA TGG CAG CCT GTG GGC CAG GAC GGG GGC CTT GCC ACC TGC	1213		
	Cys Ile Glu Trp Gln Pro Val Gly Gln Asp Gly Gly Leu Ala Thr Cys			
	370	375	380	
10	AGC CTG ACT GCG CCG CAA GAC CCG GAT CCG GCT GGA ATG GCA ACC TAC	1261		
	Ser Leu Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Pro Ala Gly Met Ala Thr Tyr			
15	385	390	395	
20	AGC TGG AGT CGA GAG TCT GGG GCA ATG GGG CAG GAA AAG TGT TAC TAC	1309		
	Ser Trp Ser Arg Glu Ser Gly Ala Met Gly Gln Glu Lys Cys Tyr Tyr			
	400	405	410	415
25	ATT ACC ATC TTT GCC TCT GCG CAC CCC GAG AAG CTC ACC TTG TGG TCT	1357		
	Ile Thr Ile Phe Ala Ser Ala His Pro Glu Lys Leu Thr Leu Trp Ser			
	420	425	430	
30	ACG GTC CTG TCC ACC TAC CAC TTT GGG GGC AAT GCC TCA GCA GCT GGG	1405		
	Thr Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly			
	435	440	445	
35	ACA CCG CAC CAC GTC TCG GTG AAG AAT CAT AGC TTG GAC TCT GTG TCT	1453		
	Thr Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser			
40	450	455	460	
45	GTG GAC TGG GCA CCA TCC CTG CTG AGC ACC TGT CCC GGC GTC CTA AAG	1501		
	Val Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys			
	465	470	475	
50	GAG TAT GTT GTC CGC TGC CGA GAT GAA GAC AGC AAA CAG GTG TCA GAG	1549		
	Glu Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu			
	480	485	490	495

ES 2 305 024 T3

5	CAT CCC GTG CAG CCC ACA GAG ACC CAA GTT ACC CTC AGT GGC CTG CGG His Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg 500 505 510	1597
10	GCT GGT GTA GCC TAC ACG GTG CAG GTG CGA GCA GAC ACA GCG TGG CTG Ala Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu 515 520 525	1645
15	AGG GGT GTC TGG AGC CAG CCC CAG CGC TTC AGC ATC GAA GTG CAG GTT Arg Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val 530 535 540	1693
20	TCT GAT TGG CTC ATC TTC TTC GCC TCC CTG GGG AGC TTC CTG AGC ATC Ser Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile 545 550 555	1741
25	CTT CTC GTG GGC GTC CTT GGC TAC CTT GGC CTG AAC AGG GCC GCA CGG Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg 560 565 570 575	1789
30	CAC CTG TGC CCG CCG CTG CCC ACA CCC TGT GCC AGC TCC GCC ATT GAG His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu 580 585 590	1837
35	TTC CCT GGA GGG AAG GAG ACT TGG CAG TGG ATC AAC CCA GTG GAC TTC Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe 595 600 605	1885
40	CAG GAA GAG GCA TCC CTG CAG GAG GCC CTG GTG GTA GAG ATG TCC TGG Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp 610 615 620	1933
45	GAC AAA GGC GAG AGG ACT GAG CCT CTC GAG AAG ACA GAG CTA CCT GAG Asp Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu	1981

ES 2 305 024 T3

	625	630	635	
5	GGT GCC CCT GAG CTG GCC CTG GAT ACA GAG TTG TCC TTG GAG GAT GGA			2029
	Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly			
	640	645	650	655
10	GAC AGG TGC AAG GCC AAG ATG TGATCGTTGA GGCTCAGAGA GGGTGAGTGA			2080
	Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met			
15		660		
	CTCGCCCGAG GCTACGTAGC CTTT			2104
20				

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 662 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (ix) RASGO:
- 35 (A) NOMBRE/CLAVE: Región
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..20
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “ Péptido señal N-terminal (1..20 o 23 o 24)”
- 40 (ix) RASGO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: Región
 - (B) LOCALIZACIÓN: 541..570
 - 45 (C) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “región transmembrana”
- (ix) RASGO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: Región
 - 50 (B) LOCALIZACIÓN: 571..662
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “ región citoplásmica de la cola”
- (ix) RASGO:
- 55 (A) NOMBRE/CLAVE: Región
 - (B) LOCALIZACIÓN: 52..64
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “motivo de secuencia de la superfamilia de receptores de cito-
quina Cys52..Cys62SW”
- 60 (ix) RASGO:
- (A) NOMBRE/CLAVE: Región
 - (B) LOCALIZACIÓN: 222..226
 - 65 (D) OTRA INFORMACION: /nota= “motivo de la superfamilia de receptor de citoquina (W222SKws)”

ES 2 305 024 T3

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 121..123

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 329..331

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 346..348

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 352..354

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 442..444

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 456..458

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Sitio de enlace N-glucosilación"

(ix) RASGO:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región

(B) LOCALIZACIÓN: 24..540

(C) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "región extracelular"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln
20 25 30

ES 2 305 024 T3

Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg
 35 40 45
 5
 Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp
 50 55 60
 10
 Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys
 65 70 75 80
 15
 Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg
 85 90 95
 20
 Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr
 100 105 110
 25
 Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro Glu
 115 120 125
 30
 Val Thr Leu Gln Leu Tyr Asn Ser Val Lys Tyr Glu Pro Pro Leu Gly
 130 135 140
 35
 Asp Ile Lys Val Ser Lys Leu Ala Gly Gln Leu Arg Met Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 40
 Thr Pro Asp Asn Gln Val Gly Ala Glu Val Gln Phe Arg His Arg Thr
 165 170 175
 45
 Pro Ser Ser Pro Trp Lys Leu Gly Asp Cys Gly Pro Gln Asp Asp Asp
 180 185 190
 50
 Thr Glu Ser Cys Leu Cys Pro Leu Glu Met Asn Val Ala Gln Glu Phe
 195 200 205
 55
 Gln Leu Arg Arg Arg Gln Leu Gly Ser Gln Gly Ser Ser Trp Ser Lys
 60
 65

ES 2 305 024 T3

	210	215	220
5	Trp Ser Ser Pro Val Cys Val Pro Pro Glu Asn Pro Pro Gln Pro Gln		
	225	230	235 240
10	Val Arg Phe Ser Val Glu Gln Leu Gly Gln Asp Gly Arg Arg Arg Leu		
	245	250	255
15	Thr Leu Lys Glu Gln Pro Thr Gln Leu Glu Leu Pro Glu Gly Cys Gln		
	260	265	270
20	Gly Leu Ala Pro Gly Thr Glu Val Thr Tyr Arg Leu Gln Leu His Met		
	275	280	285
25	Leu Ser Cys Pro Cys Lys Ala Lys Ala Thr Arg Thr Leu His Leu Gly		
	290	295	300
30	Lys Met Pro Tyr Leu Ser Gly Ala Ala Tyr Asn Val Ala Val Ile Ser		
	305	310	315 320
35	Ser Asn Gln Phe Gly Pro Gly Leu Asn Gln Thr Trp His Ile Pro Ala		
	325	330	335
40	Asp Thr His Thr Glu Pro Val Ala Leu Asn Ile Ser Val Gly Thr Asn		
	340	345	350
45	Gly Thr Thr Met Tyr Trp Pro Ala Arg Ala Gln Ser Met Thr Tyr Cys		
	355	360	365
50	Ile Glu Trp Gln Pro Val Gly Gln Asp Gly Gly Leu Ala Thr Cys Ser		
	370	375	380
55	Leu Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Pro Ala Gly Met Ala Thr Tyr Ser		
	385	390	395 400
60			
65			

ES 2 305 024 T3

Trp Ser Arg Glu Ser Gly Ala Met Gly Gln Glu Lys Cys Tyr Tyr Ile
405 410 415

5

Thr Ile Phe Ala Ser Ala His Pro Glu Lys Leu Thr Leu Trp Ser Thr
420 425 430

10

Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly Thr
435 440 445

15

Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser Val
450 455 460

20

Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys Glu
465 470 475 480

25

Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His
485 490 495

30

Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala
500 505 510

35

Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg
515 520 525

40

Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser
530 535 540

45

Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu
545 550 555 560

50

Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His
565 570 575

55

60

65

ES 2 305 024 T3

Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe
580 585 590

5 Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln
595 600 605

10 Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp
610 615 620

15 Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly
625 630 635 640

20 Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp
645 650 655

25 Arg Cys Lys Ala Lys Met
660

30

35

40

45

50

55

60

65