



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 877**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01) **C07K 14/54** (2006.01)

C12N 15/19 (2006.01) **C12N 15/24** (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01) **A61K 38/20** (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96932967 .1**

96 Fecha de presentación : **30.08.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0963377**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.1999**

54

Título: **Interleucina 19.**

73

Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**
14200 Shady Grove Road
Rockville, Maryland 20850, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.06.2009

72

Inventor/es: **Rosen, Craig, A. y**
Kenny, Joseph, J.

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.06.2009

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Interleucina 19.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una proteína interleucina 19 humana (IL-19) y a polinucleótidos que codifican esta proteína.

Técnica relacionada

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina pleiotrópica que ha sido implicada como un regulador importante de las funciones de células linfoides y mieloides. La IL-10 bloquea la activación de la síntesis de citocina y varias funciones accesorias de los macrófagos, actuando así como un potente supresor de las funciones efectoras de macrófagos, células T y células NK. La IL-10 se ha implicado también en la regulación de la diferenciación de linfocitos B, mastocitos y timocitos.

Se ha identificado IL-10 independientemente en dos líneas de experimentos diferentes. Una de estas identificó un mediador derivado de linfocitos B que coestimulaba timocitos activos (Suda y col., *Cell Immunol.* 129: 228 (1990)). La otra identificación determinó que la IL-10 está implicada en la regulación cruzada entre dos ramas efectoras a menudo mutuamente excluyentes de la inmunidad llevada a cabo por subpoblaciones de T cooperadores (CD4⁺), Th1 (implicada en las respuestas inmunitarias mediadas por célula) y Th2 (implicada en respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpo). En este papel, se expresa IL-10 por células Th2 y funciona suprimiendo la producción de citocina por células Th1, una actividad denominada actividad de factor inhibidor de la síntesis de citocina (CSIF).

Se aislaron clones de ADNc que codificaban IL-10 de murina (mIL-10) basándose en la expresión de la actividad CSIF (Moore y col., *Science* 248: 1230-1234 (1990)). Se identificaron posteriormente clones de ADNc que codificaban IL-10 humana (hIL-10) mediante hibridación cruzada con el ADNc de ratón (Vieira y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1172-1176 (1991)). Se expresa mIL-10 por células Th2 CD4⁺, al menos un clon CD8⁺, linfomas B, células T, líneas de mastocitos activados, macrófagos activados, queratinocitos y linfocitos B Ly-1 (B-1) (Fiorentino, D.F. y col., *J. Exp. Med.* 170: 2081 (1989); Moore y col., *Science* 248: 1230-1234 (1990); 87-93 (1992); Lin y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 651, O'Garra y col., *Int. Immunol.* 2: 821-832 (1990); MacNeil y col., *J. Immunol.* 145: 4167-4173 (1990); Fiorentino y col., *J. Immunol.* 147: 3815-3822 (1991); Hisatsume y col., *Lymphokine Cytokine Res.* 11: 651-683 (1992)). Se expresa hIL-10 por células T CD4⁺ humanos y clones de células T Th0, Th1 y Th2, por células T y clones CD8⁺ (Yssel y col., *J. Immunol.*), monocitos/macrófagos, queratinocitos, linfocitos B activados, linfomas B y líneas de linfoma de Burkitt infectadas con una cepa de EBV transformante, pero no con una cepa no transformante (Vieira, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1172-1176 (1991); de Waal-Malefyt, R. y col., *J. Exp. Med.* 174: 1209-1220 (1991); de Waal-Malefyt, R. y col., *J. Exp. Med.* 174: 915-924 (1991); Salgame P. y col., *Science* 254: 279-282 (1991); Yamamura, M. y col., *Science* 254: 277-279 (1991); Ralph, P. y col., *J. Immunol.* 148: 808-814 (1992); Benjamin, D. y col., *Blood* 80: 1289-1298 (1992)). En particular, Vieira y col., *PNAS*, 1991, 1172-1176 describen el factor inhibidor de la síntesis de citocina humana (CSIF) ((interleucina 10 (IL-10)), clones de ADNc que codifican IL-10 humana aislados de un clon de célula T humana específica de toxina del tétanos. Se considera que hIL-10 exhibe una gran homología de secuencia de ADN y aminoacídica con un marco abierto de lectura en el virus Epstein-Barr, BCRFI, e hIL-10 y el producto BCRFI inhiben la síntesis de citocina mediante células mononucleares de sangre periférica humanas activadas y mediante un clon Th1 de ratón. Por tanto, IL-10 no es estrictamente una citocina específica de Th2 y su patrón de expresión se parece a IL-6 más que a IL-4 o IL-5 (Wang, S.C. y col., *Transplant. Proc.* 23: 2920-2922 (1991)). Como IL-6, pero al contrario que la mayoría de las demás citocinas derivadas de células T, la expresión de IL-10 no está inhibida por la ciclosporina ni FK-506 (Wang, S.C., y col., *Transplant. Proc.* 23: 2920 (1991)).

En un intento de determinar el papel *in vivo* de IL-10, se trataron ratones normales desde el nacimiento hasta el estado adulto con anticuerpos neutralizantes de IL-10 (Wang, S.C. y col., *Transplant. Proc.* 23: 2920 (1991); Ishida, H. y col., *J. Exp. Med.* 175: 1213 (1992)). Los cambios fenotípicos resultantes incluían un nivel aumentado de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en circulación, IgM e IgA séricas reducidas, un marcado agotamiento de linfocitos B peritoneales y la incapacidad de desarrollar respuestas de anticuerpo *in vivo* ante dos antígenos bacterianos conocidos por ser combatidos por anticuerpos producidos por linfocitos B peritoneales (Hayakawa, K. y col., *Annu. Rev. Immunol.* 6: 197 (1988)). Se determinó que la reducción de linfocitos B peritoneales era una consecuencia de la elevación de IFN- γ (Ishida, H. y col., *J. Exp. Med.* 175: 1213 (1992)).

Otros experimentos han mostrado que IL-10 suprime la producción *in vitro* de monocinas inflamatorias tales como TNF- α e IL-1. Este dato corresponde a estudios *in vivo* que muestran que los antagonistas de IL-10 elevan las mismas monocinas inflamatorias. Estos resultados predicen un fuerte papel antiinflamatorio para IL-10. Además, los antagonistas de IL-10 pueden ser útiles para potenciar la inmunidad de Th1, lo que podría ser beneficioso en enfermedades infecciosas de origen vírico, o enfermedades que implican a patógenos intracelulares.

Las diversas actividades biológicas de IL-10 han conducido a predicciones de que tanto IL-10 como sus antagonistas tendrán un amplio intervalo de aplicaciones clínicas. Resulta evidente que existe una necesidad continua en la técnica de aislar citocinas novedosas capaces de mediar dichos diversos procesos biológicos.

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido IL-19 humano que tiene la secuencia aminoacídica de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) o la secuencia aminoacídica codificada por el clon de ADNc depositado como número de depósito ATCC 97662 el 17 de julio de 1996. La secuencia nucleotídica determinada secuenciando el clon de ADNc de IL-19 depositado, que se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), contiene un marco abierto de lectura que codifica un polipéptido de aproximadamente 177 restos aminoacídicos incluyendo un codón de inicio en las posiciones nucleotídicas 44-46, una secuencia líder de aproximadamente 24 restos aminoacídicos y un peso molecular deducido de aproximadamente 20,4 kDa. La secuencia de 153 aminoácidos de la proteína IL-19 madura predicha se muestra en la Figura 1 (últimos 153 restos) y en el SEQ ID NO: 2 (del resto aminoacídico 1 al resto 153).

Por tanto, un aspecto de la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo constituido por: (a) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 que tiene la secuencia aminoacídica completa mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2); (b) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 maduro que tiene la secuencia aminoacídica en las posiciones 25-177 de la Figura 1 (restos 1-153 del SEQ ID NO: 21); (c) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 que tiene la secuencia aminoacídica completa codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de ATCC n° 97662; (d) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 maduro que tiene la secuencia aminoacídica codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC n° 97662; y (e) una secuencia nucleotídica complementaria de cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c) o (d) anteriores. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico codificará el polipéptido maduro como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) o como se codifica por el ADNc depositado anteriormente descrito.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos un 90% idéntica, y más preferiblemente al menos un 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c), (d) o (e) anteriores, y que codifica un polipéptido que tiene actividad IL-19, en las que dicha actividad es la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotóxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas mediante exposición a células presentadoras de antígeno singénicas (APC) y antígeno y/o la cadena complementaria de dicho polinucleótido hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica idéntica a una secuencia nucleotídica en (a), (b), (c), (d) o (e) anteriores. El polinucleótido que hibrida no hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica constituida sólo por restos A o sólo por restos T. Una realización de ácido nucleico adicional de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia aminoacídica de una porción portadora de epítipo de un polipéptido IL-19 que tiene una secuencia aminoacídica en (a), (b), (c) o (d) anteriores.

La presente invención se refiere también a vectores recombinantes que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención y a células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a procedimientos de preparación de dichos vectores y células hospedadoras y para usarlos para la producción de polipéptidos o péptidos IL-19 mediante técnicas recombinantes.

La invención proporciona además un polipéptido IL-19 aislado que tiene una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo constituido por: (a) la secuencia aminoacídica del polipéptido IL-19 que tiene la secuencia completa de 177 aminoácidos incluyendo la secuencia líder mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2); (b) la secuencia aminoacídica del polipéptido IL-19 maduro (sin la líder) que tiene la secuencia aminoacídica en posiciones 25-177 en la Figura 1 (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2); (c) la secuencia aminoacídica del polipéptido IL-19 que tiene la secuencia aminoacídica completa incluyendo la líder codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC n° 97662; y (d) la secuencia aminoacídica del polipéptido IL-19 maduro que tiene la secuencia aminoacídica codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC n° 97662. Los polipéptidos de la presente invención incluyen también polipéptidos que tienen una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de similitud, más preferiblemente al menos 95% de similitud, con los descritos en (a), (b), (c) o (d) anteriores, así como polipéptidos que tienen una secuencia aminoacídica al menos un 80% idéntica, más preferiblemente al menos un 90% idéntica, y aún más preferiblemente un 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a las anteriores.

Una realización adicional de este aspecto de la invención se refiere a un péptido o polipéptido que tiene la secuencia aminoacídica de una porción portadora de epítipo de un polipéptido IL-19 que tiene una secuencia aminoacídica descrita en (a), (b), (c) o (d) anteriores. Los péptidos o polipéptidos que tienen la secuencia aminoacídica de una porción portadora de epítipo inmunogénico de un polipéptido IL-19 de la invención incluyen porciones de dichos polipéptidos con al menos 6 ó 7, preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos aproximadamente 30 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, aunque están incluidos también en la invención los polipéptidos portadores de epítipo de cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia aminoacídica completa de un polipéptido de la invención descrito anteriormente, siendo dicho epítipo inmunogénico una porción del polipéptido que desencadena una

respuesta de anticuerpo cuando el polipéptido entero es el inmunógeno. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido IL-19 que tiene una secuencia aminoacídica descrita en (a), (b), (c) o (d) anteriores.

Los presentes inventores creen que IL-19, que se secreta y que tiene una homología significativa con IL-10, se expresa sólo, o al menos principalmente, en monocitos activados (Figura 4). Por tanto, detectar la expresión génica de IL-19 en células del sistema inmunitario es útil para identificar monocitos activados. Además, para una serie de trastornos, los inventores creen que pueden detectarse niveles significativamente mayores o menores de expresión génica de IL-19 en fluidos corporales (por ejemplo, suero, plasma, orina, fluido sinovial o fluido espinal) tomados de un individuo que tenga dicho trastorno respecto a un nivel de expresión génica de IL-19 "estándar", concretamente, el nivel de expresión de IL-19 en fluidos corporales de un individuo que no tenga el trastorno. Por tanto, la solicitud describe un procedimiento de diagnóstico útil durante el diagnóstico de un trastorno relacionado con un nivel anormal de expresión génica de IL-19, que implica (a) ensayar el nivel de expresión génica de IL-19 en células o fluido corporal de ese individuo; (b) comparar ese nivel de expresión génica de IL-19 con un nivel de expresión génica de IL-19 estándar, con lo que un aumento o reducción del nivel de expresión génica del IL-19 ensayado comparado con el nivel de expresión estándar es indicativo de un trastorno. Un aspecto adicional de la invención está relacionado con el uso de una preparación de una composición farmacéutica para tratar un individuo necesitado de niveles reducidos de IFN- γ , TNF- α y/o IL-6, que implica administrar a dicho individuo una composición que comprende un polipéptido IL-19 de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias nucleotídica (SEQ ID NO: 1) y aminoacídica deducida (SEQ ID NO: 2) de la proteína IL-19 completa determinadas mediante secuenciación del clon de ADN contenido en el depósito ATCC n° 97662. La proteína tiene una secuencia líder de aproximadamente 24 restos aminoacídicos (subrayados) y un peso molecular deducido de aproximadamente 20,4 kDa. La secuencia aminoacídica de la proteína IL-19 madura predicha se muestra también en la Figura 1 (últimos 153 aminoácidos) (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2).

La Figura 2 es un gel de proteínas que muestra proteína IL-19 expresada a partir de la cepa de *E. coli* M15rep4 (véase el ejemplo 1).

La Figura 3 es un gel de proteínas que muestra proteínas IL-19 completas y truncadas producidas en un sistema de transcripción/traducción acoplado *in vitro* (véase el ejemplo 3).

La Figura 4 es un análisis de transferencia Northern de la expresión de IL-19 en tejido humano (HL-60, THP-1, U937 y monocitos humanos primarios) (véase el ejemplo 5).

La Figura 5 muestra las regiones de similitud entre las secuencias aminoacídicas de la proteína IL-19 e IL-10 humana (hIL-10) (SEQ ID NO: 3).

La Figura 6 muestra un análisis de la secuencia aminoacídica de IL-19, generado por el módulo Protean del paquete de software informático de análisis de secuencia DNA* Star. Se muestran las regiones de hélice alfa, lámina beta y giro predichas por los procedimientos de Chou-Fasman, Garnier-Robson y Eisenberg. Se muestran también los perfiles de hidrofiliidad e hidrofobicidad de IL-19 predichos por los procedimientos de Kyte-Doolittle y Hopp-Woods, respectivamente. Se muestra también el índice antigénico de la secuencia aminoacídica de IL-19 predicho por el procedimiento de Jameson-Wolf. Se muestran los restos aminoacídicos de IL-19 que corresponden a las regiones de pico (aminoácidos 20-28, 88-106 y 139-149) del índice antigénico de Jameson-Wolf debajo de la gráfica de índice antigénico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica la proteína IL-19 que tiene la secuencia aminoacídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2), que se determinó secuenciando un ADNc clonado. La proteína IL-19 de la presente invención comparte homología de secuencia con IL-10 humana (Figura 5) (SEQ ID NO: 3). La secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) se obtuvo secuenciando el clon de ADNc HMQBM23 que codifica un polipéptido IL-19, que se depositó el 17 de julio de 1996 en la American Type Culture Collection, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, y se le dio el número de acceso 97662. El clon depositado está contenido en el plásmido pBluescript SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA).

Moléculas de ácido nucleico

A menos que se indique otra cosa, todas las secuencias nucleotídicas determinadas secuenciando una molécula de ADN de la presente memoria se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado (tal como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc.), y todas las secuencias aminoacídicas de polipéptidos codificados por moléculas de ADN determinadas en la presente memoria se predijeron mediante traducción de una secuencia de ADN determinada como anteriormente. Por lo tanto, como es conocido en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante este enfoque automatizado, cualquier secuencia nucleotídica determinada en la presente memoria puede contener algu-

nos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas automáticamente son típicamente al menos aproximadamente un 90% idénticas, más típicamente al menos aproximadamente un 95% a al menos un 99,9% idénticas a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse más precisamente mediante otros enfoques, incluyendo procedimientos de secuenciación de ADN manuales bien conocidos en la técnica.

5 Como es también conocido en la técnica, una sola inserción o delección en una secuencia nucleotídica determinada comparada con la secuencia real causará un desplazamiento del marco de traducción de la secuencia nucleotídica de tal modo que la secuencia aminoacídica predicha codificada por una secuencia nucleotídica determinada será completamente diferente de la secuencia aminoacídica codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, partiendo del punto de dicha inserción o delección.

10 A menos que se indique otra cosa, cada “secuencia nucleotídica” expuesta en la presente memoria se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (abreviados, A, G, C y T). Sin embargo, por “secuencia nucleotídica” de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido se entiende, para una molécula de ADN o polinucleótido, una secuencia de desoxirribonucleótidos, y para una molécula de ARN o polinucleótido, la correspondiente secuencia

15 de ribonucleótidos (A, G, C y U), en que cada desoxinucleótido timidina (T) en la secuencia desoxinucleotídica especificada se reemplaza por el ribonucleótido uridina (U). Por ejemplo, la referencia a una molécula de ARN que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 expuesta usando abreviaturas de desoxirribonucleótidos, se entiende que indica una molécula de ARN que tiene una secuencia en la que cada desoxinucleótido A, G o C del SEQ ID NO: 1 se ha reemplazado por el correspondiente ribonucleótido A, G o C, y cada desoxinucleótido T se ha reemplazado por un

20 ribonucleótido U.

Usando la información proporcionada en la presente memoria, tal como la secuencia nucleotídica de la Figura 1, puede obtenerse una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido IL-19 usando procedimientos de clonación y selección estándares, tales como aquellos para clonación de ADNc usando ARNm

25 como material de partida. De forma ilustrativa de la invención, la molécula de ácido nucleico descrita en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) se descubrió en una colección de ADNc derivada de monocitos activados humanos. La secuencia nucleotídica determinada de ADNc de IL-19 de la Figura 1 contiene un marco abierto de lectura que codifica una proteína de aproximadamente 177 restos aminoacídicos con un codón de inicio en las posiciones 44-46 de la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), una secuencia líder predicha de aproximadamente 24 restos

30 aminoacídicos y un peso molecular deducido de aproximadamente 20,4 kDa. La secuencia aminoacídica de la proteína IL-19 madura predicha se muestra también en la Figura 1 (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2) desde aproximadamente el resto aminoacídico 25 hasta aproximadamente el resto 177. La proteína IL-19 mostrada en la Figura 1 (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2) es aproximadamente un 20% idéntica y aproximadamente un 46% similar a IL-10 humana (Figura 5).

35 Como un experto apreciaría, debido a las posibilidades de errores de secuenciación discutidas anteriormente, así como a la variabilidad de los sitios de escisión para líderes en diferentes proteínas conocidas, el polipéptido IL-19 real codificado por el ADNc depositado comprende aproximadamente 177 aminoácidos, pero puede estar en cualquier punto del intervalo de 170-183 aminoácidos, y la secuencia líder real de esta proteína es de aproximadamente 24 aminoácidos, pero puede estar en cualquier punto en el intervalo de aproximadamente 18 a aproximadamente 29 aminoácidos.

40 Como se indica, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, o en forma de ADN incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN o ARN monocatenario puede ser la cadena de codificación, también conocida como cadena con sentido, o puede ser la cadena de no codificación, también designada como cadena antisentido.

45 Por molécula(s) de ácido nucleico “aislada(s)” se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas con los fines de la presente invención. Ejemplos adicionales de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinantes mantenidas en células hospedadoras heterólogas o moléculas de ADN en solución purificadas (parcial o sustancialmente). Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente invención

50 incluyen además aquellas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen moléculas de ADN que comprenden un marco abierto de lectura (ORF) con un codón de inicio en las posiciones 44-46 de la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1); moléculas de ADN que comprenden la secuencia de codificación para la proteína IL-19

60 madura mostrada en la Figura 1 (últimos 153 aminoácidos) (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2) y moléculas de ADN que comprenden una secuencia sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, siguen codificando la proteína IL-19. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. Por tanto, sería rutinario para un experto generar las variantes degeneradas descritas anteriormente.

65 En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido IL-19 que tiene una secuencia aminoacídica codificada por el clon de ADNc contenido en el plásmido depositado como depósito ATCC n° 97662 el 17 de julio de 1996. Preferiblemente, esta molécula de ácido nucleico codificará el polipéptido maduro codificado por el clon de ADNc depositado descrito anteriormente. La invención proporciona además

una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o la secuencia nucleotídica de ADNc de IL-19 contenida en el clon depositado anteriormente descrito, o una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria de una de las secuencias anteriores. Dichas moléculas aisladas, particularmente moléculas de ADN, son útiles como sondas para cartografía génica mediante hibridación *in situ* con cromosomas y para detectar la expresión del gen IL-19 en tejido humano, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Northern.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una porción del polinucleótido de una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente, por ejemplo, el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC nº 97662. Por "condiciones de hibridación rigurosas", se entiende incubación durante una noche a 42°C en una disolución que comprende: 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 µg/ml, seguido de lavado de los filtros con 0,1 x SSC aproximadamente a 65°C. Por polinucleótido que hibrida con una "porción" de un polinucleótido se entiende un polinucleótido (de ADN o ARN) que hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt), y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 nt, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 30 nt, y aún más preferiblemente aproximadamente 30-70 nt del polinucleótido de referencia. Estos son útiles como sondas de diagnóstico y cebadores como se describe anteriormente y con más detalle a continuación.

Por supuesto, los polinucleótidos que hibridan con una porción mayor del polinucleótido de referencia (por ejemplo, el clon de ADNc depositado), por ejemplo, una porción de 50-750 nt de longitud, o incluso con toda la longitud del polinucleótido de referencia, son también útiles como sondas según la presente invención, ya que son polinucleótidos correspondientes a la mayoría, si no toda, la secuencia nucleotídica del ADNc depositado o la secuencia nucleotídica como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Por una porción de un polinucleótido de "al menos 20 nt de longitud", por ejemplo, se entiende 20 o más nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica del polinucleótido de referencia (por ejemplo, el ADNc depositado o la secuencia nucleotídica como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1)). Como se indica, dichas porciones son útiles para diagnóstico en forma de sonda según técnicas de hibridación de ADN convencionales o como cebadores para amplificación de una secuencia diana mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe, por ejemplo, en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, editado por Sambrook y col., J. Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Puesto que se ha depositado un clon de ADNc de IL-19 y su secuencia nucleotídica determinada se proporciona en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), generar polinucleótidos que hibriden con una porción de la molécula de ADNc de IL-19 sería rutinario para el experto. Por ejemplo, la escisión con endonucleasa de restricción o fragmentación por sonicación del clon de ADNc de IL-19 podrían usarse fácilmente para generar porciones de ADN de diversos tamaños que son polinucleótidos que hibridan con una porción de la molécula de ADNc de IL-19. Como alternativa, los polinucleótidos hibridantes de la presente invención podrían generarse sintéticamente según técnicas conocidas. Por supuesto, un polinucleótido que hibride sólo con una secuencia de poli A (tal como el tramo poli(A) 3' terminal de ADNc de IL-19 mostrado en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o con un intervalo complementario de restos T (o U) no se incluiría en un polinucleótido de la invención usado para hibridar con una porción de un ácido nucleico de la invención, puesto que dicho polinucleótido hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contuviera un intervalo poli (A) o el complemento del mismo (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

La presente solicitud describe además fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente invención. Por fragmento de molécula de ácido nucleico aislado que tiene la secuencia nucleotídica del ADNc depositado o la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), se entiende fragmentos de al menos aproximadamente 15 nt, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 nt, todavía más preferiblemente de al menos aproximadamente 30 nt, y aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 40 nt de longitud, que son útiles como sondas de diagnóstico y cebadores como se discute en la presente memoria. Por supuesto, los fragmentos mayores de 50-950 nt de longitud son también útiles ya que son fragmentos correspondientes a la mayoría, si no toda, la secuencia nucleotídica del ADNc depositado o como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Por un fragmento de al menos 20 nt de longitud, por ejemplo, se entiende fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de la secuencia nucleotídica del ADNc depositado o la secuencia nucleotídica como se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Puesto que el gen se ha depositado y se proporciona la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1), generar dichos fragmentos de ADN sería rutinario para el experto. Por ejemplo, la escisión con endonucleasa de restricción o fragmentación por sonicación podrían usarse fácilmente para generar fragmentos de diversos tamaños. Como alternativa, dichos fragmentos podrían generarse sintéticamente.

Los fragmentos de ácido nucleico preferidos de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican porciones portadoras de epítipo de la proteína IL-19. En particular, dichos fragmentos de ácido nucleico de la presente invención incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican: un polipéptido que comprende restos aminoácidos de aproximadamente 20 a aproximadamente 28 en la figura 1 (restos -5 a 4 del SEQ ID NO: 2), un polipéptido que comprende los restos aminoácidos de aproximadamente 88 a aproximadamente 106 en la Figura 1 (restos 64-82 del SEQ ID NO: 2) y un polipéptido que comprende los restos aminoácidos de aproximadamente 139 a aproximadamente 149 de la Figura 1 (restos 115-125 del SEQ ID NO: 2). Los inventores han determinado que los fragmentos polipeptídicos anteriores son regiones antigénicas de la proteína IL-19. Los procedimientos para determinar otras de dichas porciones portadoras de epítipo de la proteína IL-10 se describen con detalle a continuación.

La invención proporciona además moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica una porción de la proteína IL-19. En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos que comprenden los siguientes restos aminoácídicos de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2), que los presentes inventores han determinado que son regiones antigénicas de la proteína IL-19: restos 20-28, restos 88-106 y restos 139-149 (véase la figura 6). Los procedimientos para generar dichas porciones portadoras de epítipo de IL-19 se describen con detalle a continuación.

Como se indica, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican el polipéptido IL-19 pueden incluir, pero sin limitación, aquellas que codifican la secuencia aminoácídica del polipéptido maduro por sí mismas; la secuencia de codificación del polipéptido maduro y secuencias adicionales, tales como aquellas que codifican la secuencia líder o secretora de aproximadamente 24 aminoácidos, tal como una secuencia de pre-, pro- o preproproteína; la secuencia de codificación del polipéptido maduro, con o sin las secuencias de codificación adicionales anteriormente citadas, junto con secuencias de no codificación adicionales incluyendo, por ejemplo pero sin limitación, intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes tales como las secuencias transcritas no traducidas que desempeñan un papel en transcripción, procesamiento de ARNm, incluyendo señales de corte y empalme y poliadenilación, por ejemplo, unión a ribosoma y estabilidad del ARNm; una secuencia de codificación adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como aquellos que proporcionan funcionalidades adicionales. Por tanto, la secuencia que codifica el polipéptido puede estar fusionada con una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia aminoácídica marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (Qiagen, Inc.), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como describe en Gentz y col. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. El marcador "HA" es otro péptido útil para purificación que corresponde con un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe, que se ha descrito por Wilson y col., *Cell* 37: 767 (1984).

La presente solicitud describe además variantes de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican porciones, análogos o derivados de la proteína IL-19. Las variantes pueden aparecer de forma natural, tal como una variante alélica natural. Por una "variante alélica" se entiende una de las varias formas alternativas de que un gen ocupe un locus dado en un cromosoma de un organismo. "Genes II", Lewin, ed. Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

Dichas variantes incluyen aquellas producidas por sustituciones, deleciones o adiciones nucleotídicas. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden estar alteradas en regiones de codificación o no codificación o ambas. Las alteraciones en las regiones de codificación pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones conservativas o no conservativas. Se prefieren especialmente entre éstas las sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades de la proteína IL-19 o porciones de la misma. Se prefieren también especialmente a este respecto sustituciones conservativas. Las más altamente preferidas son moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína IL-19 madura que tiene la secuencia aminoácídica mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) o la secuencia aminoácídica de IL-19 madura codificada por el clon de ADNc depositado.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos un 90% idéntica, y más preferiblemente al menos un 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a (a) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 completo que tiene la secuencia aminoácídica completa de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) incluyendo la secuencia líder predicha; (b) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 maduro (polipéptido completo con la líder retirada) que tiene la secuencia aminoácídica de posiciones 25-177 de la Figura 1 (restos 1-153 del SEQ ID NO: 2); (c) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 completo que tiene la secuencia aminoácídica completa incluyendo la líder codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC n° 97622; (d) una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido IL-19 maduro que tiene la secuencia aminoácídica codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito ATCC n° 97662; o (e) una secuencia nucleotídica complementaria de cualquiera de las secuencias nucleotídicas en (a), (b), (c) o (d).

Por un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos, por ejemplo, un 95% "idéntica" a una secuencia nucleotídica de referencia que codifica un polipéptido IL-19, se entiende que la secuencia nucleotídica del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia polinucleotídica puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia que codifica el polipéptido IL-19. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica al menos un 95% idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, hasta un 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia pueden estar eliminados o sustituidos por otro nucleótido, o pueden insertarse en la secuencia de referencia una serie de nucleótidos de hasta un 5% de los nucleótidos totales de la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier punto entre esas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, puede determinarse convencionalmente si cualquier molécula de ácido nucleico particular es al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica, por ejemplo, a la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 o la secuencia nucleotídica del clon de ADNc depositado usando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, 1981) para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se fijan, por supuesto, de tal modo que el porcentaje de identidad se calcula para toda la longitud de la secuencia nucleotídica de referencia y que se permitan huecos de homología de hasta un 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

La presente solicitud está dirigida a moléculas de ácido nucleico al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o a la secuencia de ácido nucleico del ADNc depositado, independientemente de si codifican un polipéptido que tiene actividad IL-19. Esto es debido a que, incluso cuando una molécula de ácido nucleico particular no codifica un polipéptido que tiene actividad IL-19, un experto sabría todavía cómo usar la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como sonda de hibridación o cebador de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad IL-19 incluyen, entre otros, (1) aislar el gen IL-19 o variantes alélicas del mismo en una colección de ADNc; (2) la hibridación *in situ* (por ejemplo, "FISH") con dispersiones cromosómicas metafásicas para proporcionar una localización cromosómica precisa del gen IL-19 como se describe en Verma y col., "Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques", Pergamon Press, Nueva York (1988); y análisis de transferencia Northern para detectar la expresión de ARNm de IL-19 en tipos celulares específicos (por ejemplo, monocitos activados).

Sin embargo, se prefieren moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idénticas a la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o a la secuencia de ácido nucleico del ADNc depositado que, de hecho, codifican un polipéptido que tiene actividad de proteína IL-19. Por "un polipéptido que tiene actividad IL-19", se entiende polipéptidos que exhiben una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de la proteína IL-19 de la invención (la proteína completa o, preferiblemente, la proteína madura) como se mide en un ensayo biológico particular.

IL-19 exhibe varias actividades biológicas que podrían formar la base de dichos ensayos biológicos. En particular, los inventores creen que IL-19 tiene la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotóxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas mediante exposición a células presentadoras de antígeno singénicas (APC) y antígeno. En esta actividad, las APC se tratan de modo que se conviertan en incapaces de replicación, pero su maquinaria procesadora de antígeno permanezca funcional. Esto se consigue convenientemente irradiando las APC, por ejemplo, con aproximadamente 1.500-3.000 R (radiación gamma o X) antes de mezclar con las células T.

Como alternativa, pueden ensayarse cambios de los niveles de producción de citocina en reacciones de linfocitos primarios o, preferiblemente, secundarios mixtos (MLR), en cuyo caso no tienen que usarse APC singénicas. Las MLR son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Bradley, pág. 162-166 en Mishell y col., ed. "Selected Methods in Cellular Immunology" (Freeman, San Francisco, 1980); y Battisto y col., *Meth. in Enzymol.* 150: 83-91 (1987). Brevemente, se mezclan las poblaciones celulares, habiéndose tratado una de las poblaciones antes del mezclado para prevenir la proliferación, por ejemplo mediante irradiación. Preferiblemente, se preparan las poblaciones celulares a una concentración de aproximadamente 2×10^6 células/ml en medios suplementados, por ejemplo RPMI 1640 con suero de ternera fetal al 10%. Tanto para cultivos de control como de ensayo, se mezclan 0,05 ml de cada población para el ensayo. Para una MLR secundaria, las células restantes después de 7 días en la MLR primaria se reestiman mediante células estimulantes irradiadas recién preparadas. Puede añadirse la muestra sospechosa de contener IL-19 a los cultivos de ensayo en el momento del mezclado, y tanto en cultivos de control como de ensayo puede ensayarse la producción de citocina de 1 a 3 días después del mezclado.

Obtener poblaciones de células T y/o poblaciones de APC para ensayos de IL-19 emplea técnicas bien conocidas en la técnica que se describen completamente en DiSabato y col., ed., *Meths in Enzymol.* vol. 108 (1984). Las APC para el ensayo de IL-19 preferido son monocitos de sangre periférica. Estos se obtienen usando técnicas estándar, por ejemplo, como se describe por los siguientes artículos en el anteriormente citado de DiSabato y col., ed., *Meth. in Enzymol.* vol. 108 (1984): Boyum, pág. 88-102; Mage, pág. 118-132; Litvin y col., pág. 298-302; Stevenson, pág. 242-249 y Romain, pág. 148-153.

Preferiblemente, se usan células T cooperadoras en los ensayos de IL-19, que se obtienen separando en primer lugar linfocitos de la sangre periférica y seleccionando entonces, por ejemplo, mediante cribado o citometría de flujo, linfocitos cooperadores usando un anticuerpo anti-CD4 comercialmente disponible, por ejemplo, OKT4, descrito en la patente de EE.UU. n° 4.381.295 y disponible en Ortho Pharmaceutical Corp. Las técnicas necesarias se dan a conocer completamente por Boyum en *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (supl. 97); 77 (1968) y en *Meth. in Enzymol.* vol. 108 (1984) (citado anteriormente) y por Bram y col., *Meth. in Enzymol.* 121: 737-748 (1986). Generalmente, se obtienen PBL a partir de sangre reciente mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque.

Puede emplearse una variedad de antígenos en el ensayo, por ejemplo, hemocianina de lapa cerradura (KLH), λ -globulina aviar o similares. Más preferiblemente, en lugar de antígeno, se estimulan en el ensayo células T cooperadoras con anticuerpo monoclonal anti-CD3, por ejemplo, OKT3 dado a conocer en la patente de EE.UU. n° 4.361.549.

Se miden las concentraciones de citocina en las muestras de control y ensayo mediante ensayos biológicos y/o inmunoquímicos estándar. La construcción de ensayos inmunoquímicos para citocinas específicas es bien conocida en la técnica cuando está disponible la citocina purificada, por ejemplo, Campbell, "Monoclonal Antibody Technology" (Elsevier, Ámsterdam, 1984); Tijssen, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays" (Elsevier, Ámsterdam, 1985) y la patente de EE.UU. n° 4.486.530 son ejemplos de la extensa bibliografía sobre el tema. Están comercialmente disponibles los kits ELISA para IL-2 humana, IL-3 humana y GM-CSF humana en Genzyme Corp. (Boston, MA) y está comercialmente disponible un kit ELISA para IFN- γ humana en Endogen, Inc. (Boston, MA). Están disponibles anticuerpos policlonales específicos de linfotóxina humana en Genzyme Corp., que pueden usarse en un radioinmunoensayo para linfotóxina humana, por ejemplo, Chard, "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques" (Elsevier, Ámsterdam, 1982).

Los ensayos biológicos de las citocinas enumeradas anteriormente pueden usarse también para determinar si una muestra tiene actividad IL-19, concretamente, si una muestra modula la expresión o actividad de citocina de manera similar a IL-19. Se da a conocer un ensayo biológico para linfotóxicas humanas por Aggarwal, *Meth. in Enzymol.* 116: 441-447 (1985) y por Matthews y col., en "Lymphokines and Interferons: A Practical Approach", Clemens y col., ed. IRL Press, Washington DC, 1987, pág. 221-225. Pueden ensayarse IL-2 y GM-CSF humanas con líneas celulares CTLL-2 y KG-1 dependientes de factor, disponibles en la ATCC con números de acceso TIB 214 y CCL246, respectivamente. La IL-3 humana puede ensayarse mediante su capacidad de estimular la formación de un amplio intervalo de colonias celulares hematopoyéticas en cultivos de agar blando, por ejemplo, como se describe por Metcalf, "The Hematopoietic Colony Stimulating Factors" (Elsevier, Ámsterdam, 1984). IFN- γ puede cuantificarse con ensayos antivíricos, por ejemplo, Meager, pág. 129-147, en Clemens y col., ed. (citado anteriormente).

La producción de citocina puede determinarse también mediante análisis de ARNm. Los ARNm de citocina pueden medirse mediante hibridación puntual citoplasmática, como se describe por White y col. (*J. Biol. Chem.* 257: 8569-8572 (1982)) y Gillespie y col., patente de EE.UU. n° 4.483.920.

Otros enfoques incluyen transferencia puntual usando ARN purificado, por ejemplo, capítulo 6 de Harnes y col., ed., "Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach", IRL Press, Washington DC, 1985.

Algunas muestras para ensayar la actividad IL-19 deben pretratarse para retirar las citocinas que podrían interferir con el ensayo. Por ejemplo, IL-2 aumenta la producción de IFN- γ en algunas células. Por tanto, dependiendo de las células T cooperadoras usadas en el ensayo, IL-2 puede tener que retirarse de la muestra que se está ensayando. Dichas retiradas se facilitan convenientemente pasando una muestra por una columna de afinidad anti-citocina estándar.

Por tanto, usando un ensayo tal como los descritos anteriormente, puede compararse el efecto de la sustancia sospechosa de tener actividad IL-19 sobre la actividad de una cualquiera de una serie de citocinas con la proteína IL-19 de la invención para determinar si la muestra tiene realmente actividad IL-19.

Por supuesto, debido a la degeneración del código genético, un experto reconocerá inmediatamente que un gran número de moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico del ADNc depositado o la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) codificará un polipéptido "que tiene actividad de proteína IL-19". De hecho, puesto que las variantes degeneradas de estas secuencias nucleotídicas codifican todas el mismo polipéptido, esto resultará evidente para el experto, incluso sin efectuar uno de los ensayos de comparación descritos anteriormente. Se reconocerá además en la técnica que, para dichas moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable codificará también un polipéptido que tiene actividad de proteína IL-19. Esto es debido a que el experto es completamente conocedor de sustituciones aminoácídicas que es menos probable o improbable que afecten significativamente a la función proteica (por ejemplo, reemplazar un aminoácido alifático por un segundo aminoácido alifático).

Por ejemplo, se proporcionan directrices referentes a cómo preparar sustituciones aminoácídicas fenotípicamente silenciosas en Bowie, J.U. y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", *Science* 247: 1306-1310 (1990), en el que los autores indican que hay dos enfoques principales para estudiar la tolerancia de la secuencia aminoácídica al cambio. El primer procedimiento se basa en el proceso evolutivo, en el que las mutaciones son aceptadas o rechazadas por la selección natural. El segundo enfoque usa la ingeniería genética para introducir cambios aminoácídicos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o cribas para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Como afirman los autores, estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones aminoácídicas. Los autores indican además cuáles cambios aminoácídicos es probable que sean permisivos en una cierta posición de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de restos aminoácídicos enterrados requieren cadenas secundarias no polares, mientras que generalmente se conservan pocos rasgos de las cadenas laterales superficiales. Se describen otras de dichas sustituciones fenotípicamente silenciosas en Bowie, J.U. y col. *supra*. y las referencias citadas en el mismo.

Vectores y células hospedadoras

La presente invención se refiere también a vectores que incluyen las moléculas de ADN aisladas de la presente invención, a células hospedadoras que se modifican por ingeniería genética con los vectores recombinantes, y a la producción de polipéptidos IL-19 o porciones de los mismos mediante técnicas recombinantes.

Las construcciones recombinantes pueden introducirse en células hospedadoras usando técnicas bien conocidas tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes de replicación o defectivos de replicación. En el último caso, la propagación vírica ocurrirá generalmente sólo en células hospedadoras complementarias.

Los polinucleótidos pueden unirse a un vector que contiene un marcador selectivo para propagación en un hospedador. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular empaquetadora apropiada y transduciendo entonces en células hospedadoras.

Se prefieren vectores que comprenden regiones de control de acción en cis del polinucleótido de interés. Los factores de acción en cis apropiados pueden suministrarse por el hospedador, suministrarse por un vector complementario o suministrarse por el vector mismo tras introducción en el hospedador.

En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, los vectores proporcionan la expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo celular. Se prefieren particularmente entre dichos vectores aquellos inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como temperatura y aditivos nutrientes.

Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus Vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

El inserto de ADN debería ligarse operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores *lac*, *trp* y *tac* de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y promotores de LTR retrovíricos, por nombrar unos pocos. Serán conocidos por el experto otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para el inicio de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción. La porción de codificación de los transcritos maduros expresada por las construcciones incluirá un AUG de inicio de la traducción al inicio y un codón de terminación apropiadamente situado al final del polipéptido a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador selectivo. Dichos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivar *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas, tales como células *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimarium*; células fúngicas tales como células de levadura; células de insecto tales como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como células CHO, COS y de melanoma de Bowes y células de planta. Son conocidos en la técnica los medios de cultivo y condiciones apropiados para las células hospedadoras anteriormente descritas.

Entre los vectores preferidos para uso en bacterias se incluyen pA2, pQE70, pQE60 y pQE9, disponibles en Qia-gen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18a, pNH46A, disponibles en Stratagene y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucarióticos preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, disponibles en Stratagene y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Resultarán fácilmente evidentes para el experto otros vectores adecuados.

Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para uso en la presente invención, se incluyen los promotores *lacI* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores PR y PL y el promotor *trp* de lambda. Los promotores eucarióticos adecuados incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina cinasa HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricos, tales como los de virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína de ratón I.

La introducción del constructo en la célula hospedadora puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándares, tales como Davis y col., "Basic Methods in Molecular Biology" (1986).

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de acción en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan aumentando la actividad transcripcional de un

promotor en un tipo de célula hospedadora dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que está situado en el lado tardío del origen de replicación en las pb 100 a 270, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

- 5 Para la secreción de la proteína traducida al lumen del retículo endoplasmático, al espacio periplasmático o al entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

10 El polipéptido puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora durante la purificación o durante el posterior manejo y almacenamiento. También pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones pueden retirarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos peptídicos a polipéptidos para generar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otros, son técnicas familiares y rutinarias en la técnica. Una proteína de fusión preferida comprende una región heteróloga de una inmunoglobulina que es útil para solubilizar proteínas. Por ejemplo, el documento EP-A-O 464.533 (contrapartida canadiense 2045869) da a conocer proteínas de fusión que comprenden diversas porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es enteramente ventajosa para uso en terapia y diagnóstico, y por tanto da como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP-A 0.232.262). Por otro lado, para algunos usos sería deseable poder eliminar la parte Fc después de expresarse, detectarse y purificarse la proteína de fusión de la manera ventajosa descrita. Este es el caso cuando la porción Fc prueba ser un inconveniente para uso en terapia y diagnóstico, por ejemplo cuando la proteína de fusión ha de usarse como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de medicamentos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas tales como hIL-5 con porciones de Fc con el fin de ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5. Véanse D. Bennett y col., *Journal of Molecular Recognition*, vol. 8, 52-58 (1995) y K. Johanson y col., *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n° 16, pág. 9459-9471 (1995).

30 La proteína IL-19 puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxipatito y cromatografía en lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

35 Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procarionte o eucariote incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de planta superior, insecto y mamífero. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glucosilados o pueden estar no glucosilados. Además, los polipéptidos de la invención pueden incluir también un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador.

Polipéptidos y péptidos de IL-19

45 La invención proporciona además un polipéptido de IL-19 aislado que tiene la secuencia aminoacídica codificada por el ADNc depositado, o la secuencia aminoacídica de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2), o un péptido o polipéptido que comprende una porción de los polipéptidos anteriores. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce normalmente) y cada término puede usarse intercambiamente según requiera el contexto para indicar una cadena de al menos aminoácidos acoplados por enlaces peptídico. La palabra "polipéptido" se usa en la presente memoria para cadenas que contienen más de 10 restos aminoacídicos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptido y polipéptido en la presente memoria se escriben de izquierda a derecha y en la dirección de extremo amino a extremo carboxilo.

55 Se reconocerá en la técnica que algunas secuencias aminoacídicas del polipéptido IL-19 pueden variar sin un efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Si se contemplan dichas diferencias de secuencia, debe recordarse que habrá zonas críticas en la proteína que determinen la actividad. En general, es posible reemplazar restos que forman la estructura terciaria, a condición de que se usen restos que efectúen una función similar. En otros casos, el tipo de residuo puede no tener ninguna importancia si la alteración aparece en una región no crítica de la proteína.

60 Por tanto, la solicitud describe además variaciones del polipéptido IL-19 que muestran una actividad de polipéptido IL-19 sustancial o que incluyen regiones de la proteína IL-19 tales como las porciones proteicas discutidas anteriormente. Dichos mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de tipo (por ejemplo, sustituir un resto hidrófilo por otro, pero no uno fuertemente hidrófilo por otro fuertemente hidrófobo en general). Cambios pequeños o dichas sustituciones aminoacídicas "neutras" tendrán generalmente poco efecto sobre la actividad.

Se observan típicamente como sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, el intercambio de los restos hidroxílicos Ser y Thr, el intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los restos amídicos Asn y Gln, el intercambio de los restos básicos Lys y Arg y reemplazos entre los restos aromáticos Phe y Tyr.

Como se indica con detalle anteriormente, pueden encontrarse directrices adicionales referentes a cuáles cambios aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos (concretamente, no es probable que tengan un efecto dañino significativo sobre una función) en Bowie, J.U. y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", *Science* 247: 1306-1310 (1990).

Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente están sustancialmente purificados. Puede purificarse sustancialmente una versión producida recombinantemente del polipéptido IL-19 mediante el procedimiento de una etapa como se describe en Smith y Johnson, *Genes* 67: 31-40 (1988).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen el polipéptido codificado por el ADNc depositado, incluyendo la líder, el polipéptido maduro codificado por el ADNc depositado menos la líder (concretamente, la proteína madura), el polipéptido de la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) incluyendo la líder, el polipéptido de la figura 1 (SEQ ID NO: 2) menos la líder, así como polipéptidos que tienen al menos un 90% de similitud, más preferiblemente al menos un 95% de similitud, y todavía más preferiblemente al menos un 97%, 98% o 99% de similitud con los descritos anteriormente. Los polipéptidos adicionales de la presente invención incluyen polipéptidos al menos un 80% idénticos, más preferiblemente al menos un 90% o 95% idénticos, todavía más preferiblemente al menos un 97%, 98% o 99% idénticos al polipéptido codificado por el ADNc depositado, al polipéptido de SEQ ID NO: 2, e incluyen también porciones de dichos polipéptidos con al menos 30 aminoácidos y más preferiblemente al menos 50 aminoácidos, en los que dicho polipéptido tiene actividad IL-19, en los que dicha actividad es la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas por exposición a células presentadoras de antígeno singénicas (APC) y antígeno.

Por "% de similitud" para dos polipéptidos, se entiende una puntuación de similitud producida comparando las secuencias aminoácidas de los dos polipéptidos usando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) y los ajustes por defecto para determinar la similitud. Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, 1981) para encontrar el mejor segmento de similitud entre dos secuencias.

Por un polipéptido que tiene una secuencia aminoácida al menos, por ejemplo, un 95% "idéntica" a una secuencia aminoácida de referencia de un polipéptido IL-19, se entiende que la secuencia aminoácida del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, excepto porque la secuencia polipeptídica puede incluir hasta 5 alteraciones aminoácidas por cada 100 aminoácidos del aminoácido de referencia del polipéptido IL-19. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia aminoácida al menos un 95% idéntica a una secuencia aminoácida de referencia, hasta un 5% de los restos aminoácidos de la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro aminoácido, o pueden insertarse en la secuencia de referencia una serie de aminoácidos de hasta un 5% de los restos aminoácidos totales de la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones amino o carboxilo terminales de la secuencia aminoácida de referencia o en cualquier punto entre estas posiciones terminales, dispersados individualmente entre los restos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, puede determinarse convencionalmente si cualquier polipéptido particular es al menos un 90%, 95%, 97%, 98% o 99% idéntico, por ejemplo, a la secuencia aminoácida mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 2) o a la secuencia aminoácida codificada por el clon de ADNc depositado, usando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se fijan, por supuesto, de tal modo que el porcentaje de identidad se calcula para toda la longitud de la secuencia aminoácida de referencia y que se permitan huecos de homología de hasta un 5% del número total de restos aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se describe con detalle a continuación, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse para crear anticuerpos policlonales y monoclonales, que son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar la expresión de proteína IL-19 como se describe a continuación o como agonistas o antagonistas capaces de potenciar o inhibir la función de la proteína IL-19. Además, dichos polipéptidos pueden usarse en el sistema de dos híbridos de levadura para "capturar" proteínas de unión a proteína IL-19 que son también candidatos a agonista y antagonista según la presente invención. El sistema de dos híbridos de levadura se describe en Fields y Song, *Nature* 340: 245-246 (1989).

En otro aspecto, la invención proporciona un péptido o polipéptido que comprende una porción portadora de epítipo de un polipéptido de la invención. El epítipo de esta porción polipeptídica es un epítipo inmunogénico de un polipéptido de la invención. Un "epítipo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que desencadena

una respuesta de anticuerpo cuando toda la proteína es el inmunógeno. Estos epítomos inmunogénicos se cree que están confinados en unos pocos loci de la molécula. Por otro lado, una región de una molécula de proteína a la que puede unirse un anticuerpo se define como "epítomo antigénico". El número de epítomos inmunogénicos de una proteína es generalmente menor que el número de epítomos antigénicos. Véanse, por ejemplo, Geysen, H.M., Meloen, R.H. y Barteling, S.J. (1984). "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002.

En cuanto a la selección de péptidos o polipéptidos portadores de un epítomo antigénico (concretamente, que contienen una región de una molécula proteica a la que puede unirse un anticuerpo), es bien conocido en esa técnica que péptidos sintéticos relativamente cortos que imitan parte de una secuencia proteica son rutinariamente capaces de desencadenar un antisuero que reacciona con la proteína parcialmente imitada. Véanse, por ejemplo, Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M., Green, N. y Lerner, R.A. (1983) "Antibodies that react with predetermined sites on proteins", *Science* 219: 660-666. Los péptidos capaces de desencadenar sueros reactivos con proteína se representan frecuentemente en la secuencia primaria de una proteína, pueden caracterizarse por un conjunto de normas químicas sencillas, y no están confinados a regiones inmunodominantes de proteínas intactas (concretamente epítomos inmunogénicos) ni a los extremos amino o carboxilo. Los péptidos que son extremadamente hidrófobos y aquellos de 6 o menos restos son generalmente ineficaces para inducir anticuerpos que se unan a la proteína imitada; habitualmente son eficaces péptidos solubles más largos, especialmente aquellos que contienen restos de prolina. Sutcliffe y col., *supra*, en 661. Por ejemplo, 18 de los 20 péptidos diseñados según estas directrices, que contienen 8-39 restos que cubren un 75% de la secuencia de la cadena polipeptídica de hemaglutinina HA1 del virus de la gripe, inducían anticuerpos que reaccionaban con la proteína HAI o virus intactos; y 12/12 péptidos de la polimerasa MuLV y 18/18 de glucoproteína de la rabia inducían anticuerpos que precipitaban las proteínas respectivas.

Los péptidos y polipéptidos portadores de epítomo antigénicos descritos en la solicitud son por lo tanto útiles para crear anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a un polipéptido de la invención. Por tanto, una alta proporción de hibridomas obtenidos mediante la fusión de células de bazo de donantes inmunizados con un péptido portador de epítomo antigénico secretan generalmente anticuerpo reactivo con la proteína nativa. Sutcliffe y col., *supra*, en 663. Los anticuerpos creados por péptidos o polipéptidos portadores de epítomo antigénicos son útiles para detectar la proteína imitada, y pueden usarse anticuerpos contra diferentes péptidos para rastrear el destino de diversas regiones de un precursor proteico que experimenta procesamiento post-traduccional. Los péptidos y anticuerpos anti-peptídicos pueden usarse en una variedad de ensayos cualitativos o cuantitativos de la proteína imitada, por ejemplo, en ensayos competitivos, puesto que se ha mostrado que incluso péptidos cortos (por ejemplo, de aproximadamente 9 aminoácidos) pueden unirse a y desplazar péptidos mayores en ensayos de inmunoprecipitación. Véanse, por ejemplo Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cheren-son, A.R., Connolly, M.L. y Lerner, R.A. (1984). "The structure of an antigenic determinant in a protein", *Cell* 37: 767-778 en 777. Los anticuerpos anti-peptídicos de la invención son también útiles para la purificación de la proteína imitada, por ejemplo, mediante cromatografía de absorción usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos portadores de epítomo antigénicos descritos en la solicitud y los polipéptidos de la invención diseñados según las directrices anteriores contienen preferiblemente una secuencia de al menos 7, más preferiblemente al menos 9, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contenida en la secuencia aminoacídica de un polipéptido de la invención. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia aminoacídica de un polipéptido de la invención, que contienen de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia aminoacídica entera de un polipéptido de la invención, son considerados también péptidos o polipéptidos portadores de epítomo de la invención y son también útiles para inducir anticuerpos que reaccionan con la proteína imitada. Preferiblemente, la secuencia aminoacídica del péptido portador de epítomo se selecciona para proporcionar una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (concretamente, la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos y se evitan preferiblemente las secuencia altamente hidrófobas); y se prefieren particularmente secuencias que contienen restos de prolina.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos o péptidos antigénicos que pueden usarse para generar anticuerpos específicos de IL-19 incluyen: un polipéptido que comprende los restos aminoacídicos de aproximadamente 20 a aproximadamente 28 de la Figura 1 (restos -5 a 4 del SEQ ID NO: 2); un polipéptido que comprende los restos aminoacídicos de aproximadamente 88 a aproximadamente 106 de la Figura 1 (restos 64-82 del SEQ ID NO: 2); y un polipéptido que comprende los restos aminoacídicos de aproximadamente 139 a aproximadamente 149 de la Figura 1 (restos 115-125 del SEQ ID NO: 2). Como se indica anteriormente, los inventores han determinado que los fragmentos polipeptídicos anteriores son regiones antigénicas de la proteína endocina alfa.

Los péptidos y polipéptidos portadores de epítomo de la invención pueden producirse mediante cualquier medio convencional para preparar péptidos o polipéptidos, incluyendo medios recombinantes usando moléculas de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, puede fusionarse una secuencia aminoacídica corta portadora de epítomo con un polipéptido mayor que actúa como portador durante la producción y purificación recombinante, así como durante la inmunización para producir anticuerpos anti-peptídicos. Los péptidos portadores de epítomo pueden sintetizarse también usando procedimientos conocidos de síntesis química. Por ejemplo, Houghten ha descrito un procedimiento sencillo para la síntesis de grandes números de péptidos, tales como 10-20 mg de 248 péptidos de 13 restos diferentes que representan variantes aminoacídicas sencillas de un segmento del polipéptido HA1, que se prepararon y caracteri-

zaron (mediante estudios de unión de tipo ELISA) en menos de 4 semanas. Houghten, R.A. (1985) "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135. Este procedimiento de "síntesis peptídica múltiple simultánea (SMPS)" se describe además en la patente de EE.UU. n° 4.631.211 de Houghten y col. (1986).
 5 En este procedimiento, las resinas individuales para la síntesis en fase sólida de diversos péptidos están contenidas en paquetes permeables a disolvente separados, que posibilitan el uso óptimo en las muchas etapas repetitivas idénticas implicadas en los procedimientos en fase sólida. Puede realizarse simultáneamente un procedimiento completamente manual que permite 500-1000 o más síntesis. Houghten y col., *supra*, en 5134.

10 Los péptidos y polipéptidos portadores de epítipo de la invención se usan para inducir anticuerpos según procedimientos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sutcliffe y col., *supra*; Wilson y col., *supra*; Chow, M., Yabrov, R., Bittle, J., Hogel, J. y Baltimore, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 910-914 y Bittle, F.J., Fry, C.M., Rowlands, D.J., Brown, F. Bittle, J.L., Houghten, R.A. y Lerner, R.A. (1985) *J. Gen. Virol.* 66: 2347-2354. Generalmente, pueden inmunizarse animales con el péptido libre, sin embargo, el título de anticuerpo antipeptídico puede
 15 amplificarse acoplado el péptido con un portador macromolecular, tal como hemocianina de lapa cerradura (KLH) o toxoide del tétanos. Por ejemplo, los péptidos que contienen cisteína pueden acoplarse a un portador usando un espaciador tal como éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a un portador usando un agente espaciador más general tal como glutaraldehído. Los animales tales como conejos, ratas y ratones se inmunizan con péptidos libres o acoplados con portador, por ejemplo, mediante inyección
 20 intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 µg de péptido o proteína portadora y coadyuvante de Freund. Pueden ser necesarias varias inyecciones de recuerdo, por ejemplo a intervalos de aproximadamente 2 semanas, para proporcionar un título útil de anticuerpo antipeptídico que pueda detectarse, por ejemplo, mediante ensayo ELISA usando péptido libre adsorbido sobre una superficie sólida. El título de anticuerpos antipeptídicos en el suero de un animal inmunizado puede aumentarse mediante la selección de anticuerpos antipeptídicos, por ejemplo, mediante adsorción del péptido sobre un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados
 25 según procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos portadores de epítipo inmunogénicos de la invención, concretamente aquellas partes de una proteína que desencadenan una respuesta de anticuerpo cuando la proteína completa es inmunogénica, se identifican
 30 según procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Geysen y col., 1984, *supra*, dan a conocer un procedimiento para la síntesis rápida y simultánea sobre soportes sólidos de cientos de péptidos de suficiente pureza para reaccionar en un ensayo de inmunosorción ligado a enzima. La interacción de los péptidos sintetizados con anticuerpos se detecta entonces fácilmente sin retirarlos del soporte. De esta manera, puede identificarse rutinariamente un péptido portador de un epítipo inmunogénico de una proteína deseada por un experto. Por ejemplo, el epítipo
 35 inmunológicamente importante en la proteína de cubierta del virus de la glosopeda fue localizado por Geysen y col. con una resolución de 7 aminoácidos mediante la síntesis de un conjunto superpuesto de todos los 208 hexapéptidos posibles que cubren la secuencia entera de 213 aminoácidos de la proteína. Se sintetizó entonces un conjunto de péptidos de reemplazo completo en el que se sustituyeron todos los 20 aminoácidos a su vez en cada posición del epítipo, y se determinaron los aminoácidos particulares que conferían especificidad para la reacción
 40 con el anticuerpo. Por tanto, pueden prepararse rutinariamente mediante este procedimiento análogos peptídicos de los péptidos portadores de epítipo de la invención. La patente de EE.UU. n° 4.708.781 de Geysen (1987) describe además este procedimiento de identificación de un péptido portador de un epítipo inmunogénico de una proteína deseada.

45 Es más, la patente de EE.UU. 5.194.392 de Geysen (1990) describe un procedimiento general de detección o determinación de la secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que es un equivalente topológico del epítipo (concretamente, un "mimótopo") que es complementario de un parátipo particular (sitio de unión a antígeno) de un anticuerpo de interés. Más generalmente, la patente de EE.UU. n° 4.433.092 de Geysen (1989) describe un procedimiento de detección o determinación de una secuencia de monómeros que es un equivalente topográfico de
 50 un ligando que es complementario del sitio de unión a ligando de un receptor de interés particular. De forma similar, la patente de EE.UU. n° 5.480.971 de Houghten, R.A. y col. (1996) sobre mezclas oligopeptídicas peralquiladas da a conocer oligopéptidos peralquilados con alquilo C₁-C₇ y conjuntos y colecciones de dichos péptidos, así como procedimientos para uso de dichos conjuntos y colecciones de oligopéptidos para determinar la secuencia de un oligopéptido peralquilado que se une preferentemente a una molécula aceptora de interés. Por tanto, pueden prepararse
 55 también rutinariamente mediante estos procedimientos análogos no peptídicos de los péptidos portadores de epítipo de la invención.

Como apreciará un experto en la técnica, los polipéptidos IL-19 de la presente invención y los fragmentos portadores de epítipo de los mismos descritos anteriormente pueden combinarse con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (Ig), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una semivida *in vivo* aumentada. Esto se ha mostrado, por ejemplo, para proteínas quiméricas constituidas por los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero (documento EP A 394.827, Trauneker y col., *Nature* 331: 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimerica ligada por disulfuro debido a la
 65 parte de IgG pueden ser también más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas distintas de proteína IL-19 monomérica o fragmento de proteína sola (Fountoulakis y col., *J. Biochem.* 270: 3958-3964 (1995)).

Ensayos cromosómicos

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención son también valiosas para la identificación de cromosomas. La secuencia está orientada específicamente a y puede hibridar con una localización particular en un cromosoma humano individual. Además, existe una necesidad actual de identificar sitios particulares en el cromosoma. Actualmente están disponibles pocos reactivos marcadores de cromosoma basados en datos de secuencia reales (polimorfismos de repetición) para marcar la localización cromosómica. La cartografía de los ADN de cromosomas según la presente invención es una primera etapa importante para correlacionar estas secuencias con genes asociados a enfermedades.

En ciertas realizaciones preferidas a este respecto, el ADNc dado a conocer en la presente memoria se usa para clonar ADN genómico de un gen de proteína interleucina 19. Esto puede conseguirse usando una variedad de técnicas y colecciones bien conocidas, que generalmente están disponibles comercialmente. Se usa entonces el ADN genómico para cartografía cromosómica *in situ* usando técnicas bien conocidas con este fin. Típicamente, según procedimientos rutinarios para cartografía cromosómica, pueden ser necesarios algunos ensayos y errores para identificar una sonda genómica que dé una buena señal de hibridación *in situ*.

En algunos casos, además, pueden cartografiarse secuencias en cromosomas preparando cebadores de PCR (preferiblemente de 15-25 pb) a partir del ADNc. El análisis informático de la región 3' no traducida del gen se usa para seleccionar rápidamente cebadores que no se extienden más de un exón en el ADN genómico, complicando por tanto el proceso de amplificación. Se usan entonces estos cebadores para cribado por PCR de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente con el cebador proporcionarán una porción amplificada.

La cartografía por PCR de híbridos celulares somáticos es un procedimiento rápido para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Usando la presente invención con los mismos cebadores oligonucleotídicos, puede conseguirse la sublocalización con paneles de porciones de cromosomas específicos o conjuntos de clones genómicos grandes de manera análoga. Otras estrategias de cartografía que pueden usarse de forma similar para cartografiar su cromosoma incluyen hibridación *in situ*, precibado con cromosomas marcados separados por flujo y preselección mediante hibridación para construir colecciones de ADNc específicas de cromosoma.

La hibridación *in situ* con fluorescencia ("FISH") de un clon de ADNc con una dispersión cromosómica metafásica puede usarse para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica puede usarse con sondas de ADNc tan cortas como de 50 ó 60 pb. Para una revisión de esta técnica, véase Verma y col., "Human chromosomes: a manual of basic techniques", Pergamon Press, Nueva York (1988).

Una vez se ha cartografiado una secuencia en una localización cromosómica precisa, puede correlacionarse la posición física de la secuencia en el cromosoma con los datos del mapa genético. Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, "Mendelian inheritance in man", disponible en línea en la Johns Hopkins University, Welch Medical Library. Se identifica entonces la relación entre genes y enfermedades que se han cartografiado en la misma región cromosómica mediante análisis de entrecruzamiento (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

A continuación, es necesario determinar las diferencias en el ADNc o la secuencia genómica entre individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o todos los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

Con la resolución actual de las técnicas de cartografía física y cartografía genética, un ADNc localizado precisamente en una región cromosómica asociada a la enfermedad podría ser uno de entre 50 y 500 genes causantes potenciales (esto supone una resolución cartográfica de 1 megabase y un gen por 20 kb).

Tratamiento de afecciones patológicas mediante la inhibición por IL-19 de la producción de citocina

Como se observa anteriormente, IL-19 se secreta por monocitos activados, y comparte una homología significativa con IL-10 humana. Por tanto, los inventores creen que IL-19 es activa en la inhibición de la producción de citocina durante la respuesta inmune de mamíferos. Las citocinas cuya producción puede afectarse por IL-19 incluyen IFN- γ , TNF- α e IL-6.

Una de dichas actividades de IL-19 es la capacidad de limitar la producción excesiva de interferón gamma (IFN- γ), y por lo tanto los efectos consiguientes de dicha producción, incluyendo enfermedades autoinmunitarias asociadas a la histocompatibilidad mayor (MHC). Ya que la expresión aumentada de IFN- γ se ha implicado en un aumento de los genes de MHC, que puede aumentar entonces la posibilidad de una respuesta autoinmunitaria contra células que sobreexpresan MHC, la capacidad de limitar la expresión de IFN- γ puede ser terapéuticamente valiosa en el tratamiento de manifestaciones clínicas de dichos trastornos de MHC. Estos incluyen artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, diabetes mellitus insulín dependiente y tiroiditis.

La regulación negativa de IFN- γ por IL-19 puede ser también terapéuticamente valiosa en el tratamiento de infecciones parasitarias tales como leishmaniosis. Los niveles de IFN- γ , IL-2 e IL-4 están todos implicados en la regulación del ciclo vital de este parásito. Por tanto, la capacidad de regular la producción de estas citocinas por IL-19 sería terapéuticamente valiosa.

Dadas las actividades moduladas por IL-19, resulta fácilmente evidente que un nivel de expresión de IL-19 sustancialmente alterado (aumentado o reducido) en un individuo, en comparación con el nivel estándar o "normal", produce afecciones patológicas tales como las descritas anteriormente. Se apreciará también por un experto que, puesto que la proteína IL-19 de la invención se traduce con un péptido líder adecuado para la secreción de la proteína madura desde las células que expresan IL-19, cuando se añade proteína IL-19 (particularmente la forma madura) de una fuente exógena a células, tejidos o el cuerpo de un individuo, la proteína ejercerá sus actividades modulatorias sobre cualquiera de sus células diana. Por lo tanto, se apreciará que las afecciones causadas por una reducción del nivel estándar o normal de actividad IL-19 en un individuo pueden tratarse mediante la administración de proteína IL-19. Por tanto, la solicitud describe además un procedimiento de tratamiento de un individuo necesitado de un nivel aumentado de actividad IL-19, que comprende administrar a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un polipéptido IL-19 aislado de la invención, particularmente una forma madura de la proteína IL-19 de la invención, eficaz para aumentar el nivel de actividad IL-19 en dicho individuo.

Un experto apreciará que las cantidades eficaces de polipéptidos IL-19 para tratar in individuo necesitado de un nivel aumentado de actividad IL-19 pueden determinarse empíricamente para cada afección en las que está indicada la administración de IL-19. El polipéptido que tiene actividad IL-19 puede administrarse en composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administran a un paciente humano, el uso diario total de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se decidirá por el médico a cargo dentro del alcance del criterio médico aceptado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el tipo y grado de respuesta a conseguir, la composición específica de otro agente empleado, si lo hubiera, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo y dieta del paciente, el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción de la composición, la duración del tratamiento, los medicamentos (tales como un agente quimioterapéutico) usados en combinación o coincidentemente con la composición específica y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Por ejemplo, se predice que se obtienen resultados satisfactorios mediante la administración oral de un polipéptido que tiene actividad IL-19 en dosificaciones del orden de 0,05 a 10 mg/kg/día, preferiblemente de 0,1 a 7,5 mg/kg/día, más preferiblemente de 0,1 a 2 mg/kg/día, administradas una vez o, en dosis divididas, 2 a 4 veces al día. En la administración parenteral, por ejemplo mediante goteo o infusión i.v., pueden usarse dosificaciones del orden de 0,01 a 5 mg/kg/día, preferiblemente de 0,05 a 1,0 mg/kg/día y más preferiblemente de 0,1 a 1,0 mg/kg/día. Las dosificaciones diarias adecuadas para pacientes son por tanto del orden de 2,5 a 500 mg por vía oral, preferiblemente 5 a 250 mg por vía oral, más preferiblemente 5 a 100 mg por vía oral, o del orden de 0,5 a 250 mg por vía i.v., preferiblemente 2,5 a 125 mg por vía i.v., y más preferiblemente 2,5 a 50 mg por vía i.v.

La dosificación puede disponerse también en un paciente de manera específica para proporcionar una concentración predeterminada de una actividad IL-19 en la sangre, como se determina mediante una técnica RIA, por ejemplo. Por tanto, la dosificación al paciente puede ajustarse para conseguir niveles sanguíneos regulares continuos, medidos por RIA, del orden de 50 a 1.000 mg/ml, preferiblemente 150 a 500 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal o en forma de pulverizador oral o nasal. Por "portador farmacéuticamente aceptable", se quiere indicar una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo. El término "parenteral" como se usa en la presente memoria designa modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrasternal, subcutánea e intraarticular.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral pueden comprender disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tales como oleatos de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la presente invención pueden contener también coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser deseable también incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de la composición farmacéutica, es deseable retardar la absorción del medicamento por inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede conseguirse mediante el uso de una suspensión

líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad acuosa. La velocidad de absorción del medicamento depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y la forma cristalina. Como alternativa, se consigue la absorción retardada de una forma de medicamento administrada por vía parenteral disolviendo o suspendiendo el medicamento en un vehículo oleoso.

5

Las formas de liberación prolongada inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del medicamento en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de medicamento a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación de medicamento. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de liberación prolongada inyectables se preparan también atrapando el medicamento en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con tejidos corporales.

10

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composición sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes del uso.

15

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, se mezclan los compuestos activos con al menos un artículo de excipiente o portador farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes de tamponación.

25

Pueden emplearse también composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras rellenas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

30

Las formas de dosificación sólida de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser también de una composición que libere el(los) ingrediente(s) activo(s) sólo, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de embebido que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

35

Los compuestos activos pueden estar también en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente mencionados.

40

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes usados normalmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, nuez, germen de maíz, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos.

50

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también coadyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

55

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

El polipéptido activo puede administrarse también en forma de liposomas. Como es conocido en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman mediante cristales líquidos mono- o multilamelares hidratados que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además del agente o inhibidor, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son fosfolípidos y colatos de fosfatidilo (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los procedimientos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott. Ed., "Methods in Cell Biology", volumen XIV, Academia Press, Nueva York. N.Y., (1976), pág. 33 y siguientes.

65

Uso de IL-19 en inmunoterapia adoptiva del cáncer

Es otra aplicación terapéutica de IL-19 la administración de IL-19 en inmunoterapia adoptiva para prevenir o reducir la producción de citocinas que se cree que son responsables de muchos de los efectos secundarios dañinos actualmente encontrados en inmunoterapia adoptiva. Como se usa en la presente memoria “inmunoterapia adoptiva” significa terapia en la que se transfieren a un paciente células inmunes funcionales que combaten el cáncer. Las células inmunes que combaten el cáncer comprenden preferiblemente linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) originados en el paciente mismo. Como se conocía en la técnica, aunque IL-2 es útil en inmunoterapia adoptiva debido a su capacidad de activar los linfocitos citotóxicos transferidos al paciente (Rosenberg y col., *Ann. Rev. Immunol.* 4: 681-709 (1988)), los graves efectos secundarios causados directa o indirectamente por IL-2 han sido un obstáculo para el desarrollo de protocolos de tratamiento rutinarios basados en este enfoque (Hsu, D-H. y col., documento WO 92/12726). Ya que se cree que IL-19 es capaz de prevenir o reducir la producción de citocinas responsables de estos efectos secundarios, los TIL cultivados en presencia tanto de IL-2 como de IL-19 antes de la administración, en la que la administración de IL-2 e IL-19 continúa después de la administración de estos TIL al paciente, puede reducir los efectos secundarios dañinos típicos de la inmunoterapia adoptiva.

Uso de antagonistas de IL-19 en la restauración de la inmunocompetencia de células T cooperadoras en pacientes infectados con VIH

Otra aplicación terapéutica del polipéptido IL-19 de la invención es el uso del polipéptido para identificar antagonistas de IL-19, tales como un anticuerpo específico de unión a IL-19, que puede usarse entonces para aumentar la producción de IL-2 en células T cooperadoras. Por ejemplo, los pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tienen un nivel reducido de producción de IL-2 en células T cooperadoras no infectadas víricamente. Se cree que IL-19 es capaz de prevenir o reducir la producción de IL-2. Por lo tanto, la administración de antagonistas de IL-19 puede dar como resultado un aumento de la producción de IL-2 en pacientes infectados con VIH. Ya que IL-2 es responsable de la proliferación de células T, el mantenimiento de la producción de IL-2 es beneficioso para pacientes infectados con VIH.

Pueden prepararse antagonistas específicos de IL-19 mutando la secuencia aminoacídica de IL-19 usando procedimientos de mutagénesis estándar bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen el uso de vectores M13 para introducir mutaciones de sitio único, para eliminar aminoácidos aleatorios de IL-19, o para añadir aminoácidos. En las muteínas resultantes se ensaya entonces en ensayos estándar la capacidad de competir con IL-19 no mutada, incluyendo ensayos que ensayan la capacidad de la muteína, en comparación con la proteína IL-19 de la invención, de potenciar la proliferación *in vitro* de células T dependiente de IL-2.

Otros antagonistas de IL-19 adecuados incluyen un anticuerpo específico de unión a IL-19 (α IL-19) que interfiere con su unión al receptor de T cooperadores. La producción de dichos anticuerpos se ha descrito con detalle anteriormente.

Los anticuerpos usados en el procedimiento de la invención son preferiblemente autólogos del paciente, minimizando así problemas inmunitarios adicionales. Sin embargo, ya que los individuos inmunodeficientes necesitados de dicho tratamiento tenderán a ser menos reactivos a autoanticuerpos, serán también útiles no autoanticuerpos derivados de células de la misma especie.

Habiendo descrito en general la invención, se entenderá más fácilmente la misma por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretenden limitantes.

Ejemplos**Ejemplo 1***Expresión y purificación de IL-19 en E. coli*

Se amplificó la secuencia de ADN que codifica la proteína IL-19 madura en el clon de ADNc depositado usando cebadores oligonucleotídicos de PCR específicos de las secuencias aminoterminales de la proteína IL-19 y de secuencias de vector 3' del gen. Se añadieron nucleótidos adicionales que contenían sitios de restricción para facilitar la clonación en las secuencias 5' y 3', respectivamente.

El cebador oligonucleotídico 5' tenía la secuencia 5' GGC ATG CCA TGG AGT TAC AGT GTG TTT CCC 3' (SEQ ID NO: 4) (las secuencias específicas de la secuencia nucleotídica de IL-19 están subrayadas), e incluía un sitio de restricción *Nco*I.

El cebador 3' tenía la secuencia 5' GGA AGA TCT AGC TGA GGA CAT TAC 3' (SEQ ID NO: 5) que contenía los 15 nucleótidos subrayados complementarios de los últimos 15 nucleótidos inmediatamente después de la secuencia de codificación de la proteína IL-19 en la Figura 1. El cebador 3' incluía un sitio de restricción *Bgl*II.

Los sitios de restricción eran convenientes para los sitios de enzima de restricción del vector de expresión bacteriana pQE60, que se usaron para expresión bacteriana en estos ejemplos (Qiagen, Inc. 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). pQE60 codifica la resistencia al antibiótico ampicilina ("Amp") y contiene un origen de replicación bacteriano ("ori"), un promotor inducible por IPTG, un sitio de unión a ribosoma ("RBS"), un marcador 6-His y sitios de enzima de restricción. Se digirieron tanto el ADN de proteína IL-19 amplificado como el vector pQE60 con *Nco*I y *Bgl*II y se ligaron entonces conjuntamente los ADN digeridos. La inserción del ADN de proteína IL-19 en el vector pQE60 restringido dispuso la región de codificación de la proteína IL-19 cadena abajo y ligada operativamente al promotor inducible por IPTG del vector y en fase con un ATG de inicio apropiadamente colocado para traducción de la proteína IL-19.

Se transformó la mezcla de ligación en células *E. coli* competentes usando procedimientos estándar. Se describen dichos procedimientos en Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Se usó la cepa de *E. coli* M15/rep4, que contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor *lac* y confiere resistencia a kanamicina ("Kan") para llevar a cabo el ejemplo ilustrativo aquí descrito. Esta cepa, que es sólo una de las muchas que son adecuadas para expresar la proteína IL-19, está comercialmente disponible en Qiagen.

Se identificaron los transformantes por su capacidad de crecer en placas LB en presencia de ampicilina y kanamicina. Se aisló ADN de plásmido de colonias resistentes y se confirmó la identidad del ADN clonado mediante análisis de restricción.

Se cultivaron durante una noche los clones que contenían las construcciones deseadas ("O/N") en cultivo líquido en medio LB suplementado tanto con ampicilina (100 µg/ml) como kanamicina (25 µg/ml).

Se usó el cultivo O/N para inocular un cultivo grande, a una dilución de aproximadamente 1:100 a 1:250. Se cultivaron las células hasta una densidad óptica a 600 nm ("DO₆₀₀") de entre 0,4 y 0,6. Se añadió entonces B-D-tiogalactopiranosido de isopropilo ("IPTG") a una concentración final 0,1 mM para inducir la transcripción de promotores sensibles al represor *lac*, inactivando el represor *lacI*. Se incubaron posteriormente las células durante 4 horas adicionales (la Figura 2 muestra la inducción de proteína IL-19, las muestras retiradas 0, 3, 5, 6 y 24 horas después de la adición de IPTG se procesaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% y se tiñeron con azul brillante). Se indica la movilidad de la proteína IL-19 por una flecha. Se recogieron entonces las células mediante centrifugación y se desestabilizaron mediante agitación suave durante una noche en HCl de guanidina 6 M en tampón Na₃PO₄ 50 mM a pH 8,0 a 4°C. Se centrifugó entonces el lisado y se pasó por una columna de Sepharose CL-4B (Pharmacia). Se pasó entonces el caudal por una columna que contenía agarosa activada con Ni²⁺-NTA (Qiagen). Se recogió la proteína IL-19 de la columna en una fracción constituida por HCl de guanidina 6 M a pH 5,0. Se retiró el HCl de guanidina de la fracción que contenía IL-19 mediante diálisis frente a concentraciones sucesivamente reducidas de guanidina en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 5,5.

Ejemplo 2

Clonación y expresión de IL-19 en un sistema de expresión de baculovirus

Se amplificó la secuencia de ADNc que codifica la proteína IL-19 completa en el clon depositado usando cebadores oligonucleotídicos de PCR correspondientes a las secuencias 5' y 3' del gen:

El cebador 5' tenía la secuencia 5' GGC GGG ATC CCG CCA TCA TGA AGT TAC AGT GTG TTT CCC 3' (SEQ ID NO: 6) que contenía el sitio de enzima de restricción *Bam*HI subrayado seguido por 29 bases de la secuencia de la proteína IL-19 de la Figura 1. Insertado en un vector de expresión, como se describe a continuación, el extremo 5' del fragmento amplificado que codifica IL-19 proporcionó un péptido señal eficaz. Una señal de inicio de la traducción eficaz en células eucariotas, como se describe por Kozak, M., *J. Mol. Biol.* 196: 947-950 (1987) está localizada apropiadamente en la porción de vector del constructo.

El cebador 3' tenía la secuencia 5' CCC AAG CTT GGT ACC TCA TCA AGC TGA GGA CAT TAC 3' (SEQ ID NO: 7) que contenía el sitio de restricción *Asp*718 seguido de nucleótidos complementarios de los últimos 21 nucleótidos de la secuencia de codificación de IL-19 expuesta en la Figura 1.

Se aisló el fragmento amplificado de gel de agarosa al 1% usando un kit comercialmente disponible ("GeneClean", BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Se digirió entonces el fragmento con *Bam*HI y *Asp*718 y se purificó de nuevo en un gel de agarosa al 1%. Este fragmento se designa en la presente memoria F2.

Se usaron el vector y pA2-GP para expresar la proteína IL-19 en el sistema de expresión de baculovirus, usando procedimientos estándar como se describen en Summers y col., "A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures", Texas Agricultural Experimental Station Bulletin n° 1555 (1987). Este vector de expresión contiene el promotor fuerte de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) seguido por sitios de restricción convenientes. El péptido señal de AcMNPV gp67, que incluye la metionina N-terminal, está localizado justo cadena arriba de un sitio *Bam*HI. El sitio de poliadenilación del virus de simio 40 ("SV40") se usa para una poliadenilación eficaz. Para una selección sencilla del virus recombinante, se inserta el

gen de beta-galactosidasa de *E. coli* en la misma orientación que el promotor de polihedrina y seguido por la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Las secuencias de polihedrina están flanqueadas a ambos lados por secuencias víricas para recombinación homóloga mediada por célula con ADN vírico de tipo silvestre para generar virus viables que expresen el polinucleótido clonado. La proteína IL-19 se expresó también en baculovirus usando el vector pA2.

Podrían usarse muchos otros baculovirus en lugar de pA2-GP, tales como pAc373, pVL941 y pAcIM1 a condición de que, como apreciarán fácilmente los expertos, esa construcción proporcione señales localizadas apropiadamente para transcripción, traducción, tráfico y similares, tales como un AUG en fase y un péptido señal, según sean necesarios. Dichos vectores se describen en Luckow y col., *Virology* 170: 31-39, entre otros.

Se digirió el plásmido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Asp*718 y se desfosforiló entonces usando fosfatasa intestinal de ternero, usando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. Se aisló entonces el ADN a partir de gel de agarosa al 1% usando un kit comercialmente disponible ("Geneclean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Este vector de ADN se designa en la presente memoria "V2".

Se ligaron conjuntamente el fragmento F2 y el plásmido desfosforilado V2 con ADN ligasa T4. Se transformaron células HB101 de *E. coli* con mezcla de ligación y se extendieron en placas de cultivo. Se identificaron bacterias que contenían el plásmido con el gen IL-19 humano digiriendo ADN de colonias individuales usando *Bam*HI y *Asp*718 y analizando entonces el producto de digestión mediante electroforesis en gel. Se confirmó la secuencia del fragmento clonado mediante secuenciación de ADN. Este plásmido se designa en la presente memoria pBacIL-19.

Se cotransfectaron 5 µg del plásmido pBacIL-19 con 1,0 µg de un ADN de baculovirus linealizado comercialmente disponible ("ADN de baculovirus BaculoGold™"; Pharmingen, San Diego, CA) usando el procedimiento de lipofección descrito por Felgner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417 (1987). Se mezclaron 1 µg de ADN vírico BaculoGold™ y 5 µg del plásmido pBacCKβ-15 en un pocillo estéril de una placa de microvaloración que contenía 50 µl de medio Grace exento de suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Después de ello, se añadieron 10 µl de lipofectina más 90 µl de medio Grace, se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió entonces gota a gota la mezcla de transfección a células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo de tejido de 35 mm con 1 ml de medio Grace sin suero. Se sacudió la placa para mezclar la disolución recién añadida. Se incubó entonces la placa durante 5 horas a 27°C. Después de 5 horas, se retiró la disolución de transfección de la placa y se añadió 1 ml de medio de insecto Grace suplementado con suero fetal de ternero al 10%. Se devolvió a un incubador la placa y se continuó el cultivo a 27°C durante 4 días.

Después de 4 días, se recogió el sobrenadante y se efectuó un ensayo en placa, como se describe por Summers y Smith, citado anteriormente. Se usó un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) para permitir una fácil identificación y aislamiento de clones que expresan Gal, que producen placas teñidas de azul (puede encontrarse también una descripción detallada de un "ensayo en placa" de este tipo en la "User's guide for insect cell culture and baculovirology" distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, página 9-10).

4 días después de la dilución en serie, se añadió el virus a las células. Después de una incubación apropiada, se recogieron las placas teñidas de azul con la punta de una pipeta Eppendorf. Se resuspendió entonces el agar que contenía los virus recombinantes en un tubo Eppendorf que contenía 200 µl de medio Grace. Se retiró el agar mediante una breve centrifugación y se usó el sobrenadante que contenía el baculovirus recombinante para infectar células Sf9 sembradas en cubetas de 35 mm. 4 días después, se recogieron los sobrenadantes de estas cubetas de cultivo y se almacenaron entonces a 4°C. Se identificó un clon que contenía hESSB I, II y III apropiadamente insertados mediante análisis de ADN incluyendo cartografía de restricción y secuenciación. Éste se designa en la presente memoria V-IL-19.

Se cultivaron células Sf9 en medio Grace suplementado con FBS inactivado térmicamente al 10%. Se infectaron las células con el baculovirus recombinante V-IL-19 a una multiplicidad de infección ("MOI") de aproximadamente 2 (aproximadamente 1 a aproximadamente 3). 6 horas después, se retiró el medio y se reemplazó por medio SF900 II menos metionina y cisteína (disponible en Life Technologies Inc., Gaithersburg). 42 horas después, se añadieron 5 µCi de ³⁵S-metionina y 5 µCi de ³⁵S-cisteína (disponible en Amersham). Se incubaron además las células durante 16 horas y se recogieron entonces mediante centrifugación, se lisaron y se visualizaron las proteínas marcadas mediante PAGE-SDS y autorradiografía.

Ejemplo 3

Transcripción/traducción in vitro de proteína IL-19

Se prepararon proteínas IL-19 recombinantes usando el sistema de extracto de germen de trigo acoplado TNT (Promega, Madison, WI).

Se combinaron 25 µl de extracto de germen de trigo TNT, 10 U de ARN polimerasa T3, mezcla de aminoácidos 1 mM (exenta de metionina), 4 µCi de ³⁵S-metionina (1000 Ci/mmol), 40 U de RNasin® (Promega, Madison, WI) y 1 µg de ADN molde en un volumen final de 50 µl y se incubaron a 30°C durante 2 h. Las reacciones de trans-

cripción/traducción acopladas incluían los siguientes ADN molde: (1) sin ADN, (2) pBluescript, (3) los nucleótidos 44-577 (correspondientes a los aminoácidos 1-177) de la secuencia de IL-19 mostrada en la Figura 1 clonada en pBluescript, (4) los nucleótidos 116-577 (correspondientes a los aminoácidos 25-177 mostrados en la Figura 1 de la secuencia de codificación de IL-19 clonada en pBluescript, (5) un producto de PCR purificado en gel derivado del molde descrito en (3) y amplificado usando cebadores de codificación e inversos M13 en una reacción PCR estándar. Se calentaron las mezclas a 95°C durante 10 minutos y se cargó entonces una alícuota de 5 µl de cada muestra en un gel de poliacríamida al 15%. Se procesó el gel a 100 voltios durante aproximadamente 2 horas. Se secó entonces el gel y se expuso a película de rayos X durante 3 días a temperatura ambiente. Se indica la movilidad de las proteínas IL-19 completa y truncada (sin secuencia señal) en la Figura 3. Un marcador de masa molecular aparente (M) muestra las movilidades relativas de proteínas de 14,3, 21,5, 30, 46, 97,4 y 220 kDa.

Ejemplo 4

15 *Clonación y expresión en células de mamífero*

La mayoría de los vectores usados para la expresión transitoria de la secuencia génica de la proteína IL-19 en células de mamífero deben portar el origen de replicación de SV40. Éste permite la replicación del vector con alto número de copias en células (por ejemplo células COS) que expresan el antígeno T necesario para el inicio de la síntesis de ADN vírico. Puede utilizarse también cualquier otra línea celular de mamífero con este fin.

Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor, que media el inicio de la transcripción de ARNm, la secuencia de codificación de proteína y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para corte y empalme de ARN. Puede conseguirse una transcripción altamente eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV, HIV y el promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, pueden usarse también señales celulares (por ejemplo, promotor de actina humana). Los vectores de expresión adecuados para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37512), pSV2dhfr (ATCC 37416) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células hospedadoras de mamífero que podrían usarse incluyen células humanas Hela, 283, H9 y Jurkat, células de ratón NIH3T3 y C127, células de mono verde africano Cos 1, Cos 7 y CV1, células de codorniz QC1-3, células L de ratón y células de ovario de hámster chino.

Como alternativa, el gen puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador selectivo tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado puede amplificarse también para expresar grandes cantidades de la proteína codificada. La DHFR (dihidrofolato reductasa) es un marcador útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy y col., *Biochem. J.* 227: 277-279 (1991); Bebbington y col., *BioTechnology* 10: 169-175 (1992)). Usando estos marcadores, se cultivan las células de mamífero en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el(los) gen(es) amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) se usan a menudo para la producción de proteínas.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen y col., "Molecular and Cellular Biology", 438-4470 (marzo de 1985)) más un fragmento del potenciador CMV (Boshart y col., *Cell* 41: 521-530 (1985)). Múltiples sitios de clonación, por ejemplo con los sitios de escisión por enzima de restricción *Bam*HI, *Xba*I y *Asp*718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además del intrón 3' la señal de poliadenilación y terminación del gen de preproinsulina de rata.

Ejemplo 4(a)

Clonación y expresión en células COS

Se prepara el plásmido de expresión pIL-19 HA clonando un ADNc que codifica IL-19 en el vector de expresión pcDNA4 (que puede obtenerse en Invitrogen, Inc.).

El vector de expresión pcDNA4 contiene: (1) un origen de replicación de *E. coli* eficaz para propagación en *E. coli* y otras células procariotas; (2) un gen de resistencia a ampicilina para la selección de células procariotas que contienen plásmido; (3) un origen de replicación de SV40 para propagación en células eucariotas; (4) un promotor CMV, un sitio de policlonaje, un intrón SV40 y una señal de poliadenilación dispuestos de tal modo que un ADNc pueda colocarse convenientemente bajo el control de expresión del promotor CMV y ligado operativamente con el intrón SV40 y la señal de poliadenilación mediante sitios de restricción en el sitio de policlonaje.

ES 2 322 877 T3

Se clona un fragmento de ADN que codifica la proteína IL-19 y un marcador HA fusionado en fase con su extremo 3' en la región del sitio de policlonaje del vector de modo que la expresión de proteína recombinante esté dirigida por el promotor CMV. El marcador HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe descrito por Wilson y col., *Cell* 37: 767 (1984). La fusión del marcador HA con la proteína diana permite una fácil detección de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA.

La estrategia de construcción de plásmido es la siguiente. Se amplifica el ADNc de IL-19 del clon depositado usando cebadores que contienen sitios de restricción convenientes, como se describe anteriormente respecto a la construcción de vectores de expresión para la expresión de IL-19 en *E. coli*. Para facilitar la detección, purificación y caracterización de la IL-19 expresada, uno de los cebadores contiene un marcador de hemaglutinina ("marcador HA") como se describe anteriormente.

Los cebadores adecuados incluyen los siguientes, que se usan en este ejemplo. El cebador 5', que contiene el sitio *Bam*HI subrayado, un codón de inicio AUG y 22 pb de la región de codificación 5', tiene la siguiente secuencia:

5' GGC GGG ATC CCG CCA TGA AGT TAC AGT GTG TTT
CCC 3' (SEQ ID NO:8).

El cebador 3', que contiene el sitio *Asp*718 subrayado, un codón de paro, formándose 10 codones después de ello el marcador de hemaglutinina HA, y 25 pb de secuencia de codificación 3' (en el extremo 3'), tiene la siguiente secuencia:

5' CCC AAG CTT GGT ACC TCA TCA GAA AGC GTA GTC
TGG GAC GTC GTA TGG GTA AGC TGA GGA CAT TAC TTC ATG
ATT C 3' (SEQ ID NO:9).

Se digieren el fragmento de ADN amplificado por PCR y el vector pcDNAI/Amp con *Hind*III y *Xho*I y después se ligan. Se transforma la mezcla de ligación en la cepa SURE de *E. coli* (disponible en Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037), y se siembra el cultivo transformado sobre placas con medio ampicilina que se incuban después, permitiendo el crecimiento de colonias resistentes a la ampicilina. Se aísla el ADN de plásmido de colonias resistentes y se examina mediante análisis de restricción y calibración en gel la presencia del fragmento que codifica IL-19.

Para la expresión de IL-19 recombinante, se transfectan células COS con un vector de expresión como se describe anteriormente, usando DEAE-dextrano como se describe, por ejemplo, en Sambrook y col., "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Se incuban las células en condiciones para la expresión de IL-19 por el vector.

Se detecta la expresión de la proteína de fusión IL-19/HA mediante radiomarcaje e inmunoprecipitación, usando procedimientos descritos, por ejemplo, en Harlow y col., "Antibodies: a laboratory manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988). Con este fin, dos días después de la transfección se marcan las células mediante incubación en medio que contiene ³⁵S-cisteína durante 8 horas. Se recogen las células y el medio y se lavan las células y el lisado con tampón RIPA que contiene detergente: NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,1 de SDS, 1% de NP-40, 0,5% de DOC, Tris 50 mM, pH 7,5, como se describe por Wilson y col., citado anteriormente. Se precipitan las proteínas del lisado celular y del medio de cultivo usando un anticuerpo monoclonal específico de HA. Se analizan entonces las proteínas precipitadas mediante geles SDS_PAGE y autorradiografía. Se observa una producción de expresión del tamaño esperado en el lisado celular que no se observa en controles negativos.

Ejemplo 4(b)

Clonación y expresión en células CHO

Se usa el vector pC4 para la expresión de proteína IL-19. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (nº de acceso ATTC 37146). Ambos plásmidos contienen el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Las células de ovario de hámster chino u otras que carecen de actividad dihidrofolato que se transfectan con estos plásmidos pueden seleccionarse cultivando las células en un medio selectivo (MEM alfa menos, Life Te-

chnologies) suplementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de genes DHFR en células resistentes a metotrexato (MTX) ha sido bien documentada (véanse, por ejemplo, Alt, F.W., Kellems, R.M., Bertino, J.R. y Schimke, R.T., 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 1357-1370, Hamlin, J.L. y Ma, C. 1990, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1097: 107-143, Page, M.J. y Sydenham, M.A., 1991, *Biotechnology* vol. 9: 64-68). Las células cultivadas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al medicamento mediante sobreproducción de la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen DHFR. Si está ligado un segundo gen al gen DHFR, habitualmente se coamplifica y se sobreexpresa. Es estado de la técnica desarrollar líneas celulares que portan más de 1.000 copias de los genes. Posteriormente, cuando se extrae el metotrexato, las líneas celulares que contienen el gen amplificado se integran en el(los) cromosoma(s).

El plásmido pC4 contiene para la expresión del gen de interés un promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen y col., "Molecular and cellular biology", marzo de 1985; 438-4470) más un fragmento aislado del potenciador del gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV) (Boshart y col., *Cell* 41: 521-530, 1985). Cadena abajo del promotor están los siguientes sitios de escisión por enzima de restricción individuales que permiten la integración de los genes: *Bam*HI, *Pvu*II y *Nru*I. Detrás de estos sitios de clonación, el plásmido contiene codones de paro de traducción en los tres marcos de lectura seguidos del intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de preproinsulina de rata. Pueden usarse también otros promotores de alta eficacia para la expresión, por ejemplo, el promotor de β -actina humana, los promotores temprano o tardío de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV. Para la poliadenilación del ARNm, pueden usarse también otras señales, por ejemplo, de genes de hormona de crecimiento humana o globina.

Las líneas celulares estables que portan un gen de interés integrado en los cromosomas pueden seleccionarse tras cotransfección con un marcador selectivo tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso usar más de un marcador selectivo al inicio, por ejemplo, G418 más metotrexato.

Se digiere el plásmido pC4 con la enzima de restricción *Bam*HI y se desfosforila entonces usando fosfatasa intestinal de ternero mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se aísla entonces el vector a partir de un gel de agarosa al 1%.

Se amplifica la secuencia de ADN que codifica la proteína IL-19 usando cebadores oligonucleotídicos de PCR específicos de la secuencia aminoterminal de la proteína IL-19 y de la secuencia 3' carboxiterminal del gen. Se añaden a las secuencias 5' y 3', respectivamente, nucleótidos adicionales que contienen sitios de restricción para facilitar la clonación.

El cebador 5' tiene la secuencia 5' GGC GGG ATC CCG CCA TCA TGA AGT TAC AGT GTG TTT CCC 3' (SEQ ID NO: 10), que contiene el sitio de enzima de restricción *Bam*HI subrayado seguido de secuencia de Kozak y 23 bases de la secuencia de IL-19 en la Fig. 1. El cebador 3' tiene la secuencia 5' CCC AAG CTT GGT ACC TCA TCA AGC TGA GGA CAT TAC 3' (SEQ ID NO: 11), que contiene el sitio de restricción *Asp*718 subrayado seguido de nucleótidos complementarios de 15 pb de la secuencia nucleotídica que precede al codón de paro en la Fig. 1. Los sitios de restricción son convenientes para sitios de enzima de restricción en el vector de expresión pC4 en CHO.

Se aíslan los fragmentos amplificados a partir de un gel de agarosa al 1% como se describe anteriormente y se digieren entonces con las endonucleasas *Bam*HI y *Asp*718, y se purifican entonces de nuevo en gel de agarosa al 1%.

Se ligan entonces el fragmento aislado y el vector desfosforilado con ADN ligasa T4. Se transforman entonces células HB101 de *E. coli* y se identifican las bacterias que contenían el plásmido pC4 insertado en la orientación correcta usando la enzima de restricción *Bam*HI. Se confirma la secuencia del gen insertado mediante secuenciación de ADN.

Transfección de células CHO-DHFR

Se usan células de ovario de hámster chino que carecen de una enzima DHFR activa para transfección. Se cotransfectan 5 μ g del plásmido de expresión pC4 con 0,5 μ g del plásmido pSVneo usando el procedimiento de lipofección (Felgner y col., *supra*). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador selectivo dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos que incluye G418. Se siembran las células en MEM alfa menos suplementado con G418 1 mg/ml. Después de 2 días, se tripsinizan las células y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) y se cultivan durante 10-14 días. Después de este periodo, se tripsinizan los clones individuales y se siembran entonces en cubetas Petri de 6 pocillos usando diferentes concentraciones de metotrexato (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM). Se transfieren entonces los clones que crecen a las mayores concentraciones de metotrexato a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones aún mayores de metotrexato (500 nM, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M). Se repite el mismo procedimiento hasta que los clones crecen a una concentración 100 μ M.

Se analiza la expresión del producto génico deseado mediante análisis de transferencia Western y SDS_PAGE.

Ejemplo 5

Distribución en tejido de la expresión de proteína IL-19

5 Se llevó a cabo un análisis de transferencia Northern para examinar los niveles de expresión de proteína IL-19 en tejidos humanos, usando procedimientos descritos por, entre otros, Sambrook y col., citado anteriormente.

10 Se cultivaron las líneas celulares HL-60, THP-1 y U937 y monocitos humanos primarios aislados mediante adherencia de una población de leucocitos mixtos durante 12 horas en presencia (+) o ausencia (-) de lipopolisacárido bacteriano (LPS). Se preparó el ARN total de los cultivos con reactivo TRIzol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) esencialmente como se describe por el fabricante. Se secó completamente el ARN total (10 µg), se resuspendió en un tampón de carga de formamida/formaldehído y se resolvió mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% que contiene formaldehído 2,2 M. Se transfirió el gel durante una noche en 20 x SSC a una membrana de nailon (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN). Se preparó ADN de sonda mediante PCR, amplificando el inserto de IL-19 entero mostrado en la Figura 1 usando cebadores de codificación e inversos M13. Se marcó ADN de sonda (25 ng) con ³²P usando el kit de marcaje RediPrime Random Primer (Amersham Life Science) con una actividad específica de más de 10⁶ cpm/mg. Se hibridó la transferencia con sonda desnaturalizada en 10 ml de disolución de hibridación de hibridol durante una noche a 42°C. Se lavó entonces la transferencia en aproximadamente 100 ml de 0,2 x SSC/0,1% de SDA a 25°C durante 20 minutos, y después dos veces en aproximadamente 100 ml de 0,2 x SSC/0,1% de SDS a 65°C durante 15 min. Se expuso entonces la transferencia a película de rayos X durante 5 días, y se muestra en la Figura 4. La flecha muestra la migración del ARN específico de IL-19. Un marcador de ARN muestra las movilidades relativas de ARN de 0,24, 1,35, 2,37, 4,40, 7,46 y 9,49 kb.

25 Resultará evidente que la invención puede practicarse de otro modo que como se describe particularmente en la descripción y los ejemplos anteriores.

Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la vista de las enseñanzas anteriores y, por lo tanto, están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por:

- (a) un polinucleótido que codifica los restos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 2;
 - (b) un polinucleótido que codifica los restos -24 a 153 de la SEQ ID NO: 2;
 - (c) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos 116 a 574 de la SEQ ID NO: 1;
 - (d) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos 44 a 574 de la SEQ ID NO: 1;
 - (e) un polinucleótido que codifica la forma madura del polipéptido codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662;
 - (f) un polinucleótido que codifica el polipéptido completo codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662;
 - (g) un polinucleótido que tiene la secuencia de codificación del ADNc contenido en la ATCC 97662 que codifica la forma madura del polipéptido;
 - (h) un polinucleótido que tiene la secuencia de codificación del ADNc contenido en la ATCC 97662 que codifica el polipéptido completo;
 - (i) un polinucleótido que codifica una porción portadora de epítipo inmunogénico de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (h), en el que dicho epítipo inmunogénico es una porción del polipéptido que desencadena una respuesta de anticuerpo cuando el polipéptido completo es el inmunógeno;
 - (j) un polinucleótido que codifica una porción portadora de epítipo de un polipéptido IL-19 que comprende los restos aminoácidos VDNHGLRRC o RVFKDHPNPVKILRKISS;
 - (k) un polinucleótido idéntico en al menos un 90% al polinucleótido como se define en una cualquiera de (a) a (h) y que codifica un polipéptido que tiene actividad IL-19, en el que dicha actividad es la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas mediante exposición a células presentadoras de antígeno singénicas (APC) y antígeno; y
 - (l) un polinucleótido idéntico en al menos un 90% al polinucleótido como se define en una cualquiera de (a) a (h), en el que la cadena complementaria de dicho polinucleótido hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con el polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (h);
- o la cadena complementaria de dicho polinucleótido.

2. El polinucleótido de la reivindicación 1, que es ADN o ARN.

3. El polinucleótido de la reivindicación 2, que es ADN genómico.

4. El polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, fusionado con un polinucleótido heterólogo.

5. El polinucleótido de la reivindicación 4, en el que el polinucleótido heterólogo codifica un polipéptido heterólogo.

6. El polinucleótido de la reivindicación 5, en el que el polipéptido heterólogo está fusionado con un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

7. Un procedimiento de preparación de un vector recombinante que comprende insertar un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un vector.

8. Un vector que contiene el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o producido mediante el procedimiento de la reivindicación 7.

9. El vector de la reivindicación 8, en el que el polinucleótido está unido operativamente a secuencias de control de la expresión, permitiendo la expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas.

10. Un procedimiento de preparación de una célula hospedadora recombinante que comprende introducir el vector de la reivindicación 8 ó 9 en una célula hospedadora.

11. Una célula hospedadora modificada por ingeniería genética con el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de la reivindicación 8 ó 9 o producida mediante el procedimiento de la reivindicación 10.
12. La célula hospedadora de la reivindicación 11, en la que dicha célula hospedadora es una célula procariota, célula eucariota, célula animal, célula de mamífero, célula de insecto, célula de planta, célula fúngica, célula COS, célula CHO o célula de *E. coli*.
13. Un procedimiento para producir un polipéptido que tiene actividad IL-19, en el que dicha actividad es la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas mediante exposición a células presentadoras de antígeno singénicas (APC) y antígeno, que comprende: cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 ó 12 en condiciones tales que se exprese dicho polipéptido y se recupere el polipéptido codificado por dicho polinucleótido del cultivo.
14. Un polipéptido que tiene la secuencia aminoacídica codificada por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 13.
15. Un polipéptido seleccionado del grupo constituido por:
- (a) un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos un 80% idéntica a los restos aminoacídicos -24 a 153 de la SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (b) un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos un 80% idéntica a los restos aminoacídicos 1 a 153 de la SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (c) un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos un 80% idéntica al polipéptido completo codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (d) un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica al menos un 80% idéntica a la forma madura del polipéptido codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (e) un polipéptido constituido por al menos 30 aminoácidos contiguos de los restos aminoacídicos -24 a 153 del SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (f) un polipéptido constituido por al menos 50 aminoácidos de los restos aminoacídicos -24 a 153 del SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19;
 - (g) un polipéptido constituido por al menos 30 aminoácidos del polipéptido completo codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19; y
 - (h) un polipéptido constituido por al menos 50 aminoácidos del polipéptido completo codificado por el ADNc contenido en la ATCC 97662, en el que dicho polipéptido tiene actividad IL-19, en el que dicha actividad IL-19 de uno cualquiera de (a) a (h) es la propiedad de modular la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células T cooperadoras inducida a sintetizar una o más de estas citocinas mediante exposición a células presentadoras de antígeno singénico (APC) y antígeno.
16. El polipéptido de la reivindicación 14 ó 15, en el que dicho polipéptido está radiomarcado o glucosilado.
17. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que dicho polipéptido está fusionado a un polipéptido heterólogo.
18. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que dicho polipéptido carece de una metionina N-terminal.
19. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16.
20. El anticuerpo de la reivindicación 19, en el que dicho anticuerpo es policlonal o monoclonal.
21. Una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cadena complementaria de dicho polinucleótido que hibrida, es al menos un 90% idéntica a un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
22. Un antagonista del polipéptido de la reivindicación 14 ó 15, en el que dicho antagonista es el anticuerpo de la reivindicación 19 ó 20.

ES 2 322 877 T3

23. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, el anticuerpo de la reivindicación 19 ó 20 o el antagonista de la reivindicación 22, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 24. Una composición de diagnóstico que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el anticuerpo de la reivindicación 19 ó 20.

10 25. Uso del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un individuo necesitado de niveles reducidos de IFN- γ , TNF- α y/o IL-6, de artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, infecciones parasitarias o para “inmunoterapia adoptiva” de cáncer.

15 26. Uso del antagonista de la reivindicación 22 o el anticuerpo de la reivindicación 19 ó 20 para la preparación de una composición farmacéutica para aumentar la producción de IL-2.

27. Uso del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18 en la preparación de un medicamento.

28. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20 en la preparación de un medicamento.

20 29. Uso del antagonista de la reivindicación 22 en la preparación de un medicamento.

30 30. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un individuo necesitado de niveles reducidos de IFN- γ , TNF- α y/o IL-6, de artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, diabetes mellitus insulino dependiente, tiroiditis, infecciones parasitarias o para “inmunoterapia adoptiva” de cáncer, que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.

31. Una composición farmacéutica para aumentar la producción de IL-2, que comprende el antagonista de la reivindicación 22 o el anticuerpo de las reivindicaciones 19 ó 20.

GGCACGAGCACAAGGAGCAGCCCGCAAGCACCAAGTGAGAGGCATGAAGTTACAGTGTGT 60
M K L Q C V

TTCCCTTTGGCTCCTGGGTACAATACTGATATTGTGCTCAGTAGACAACCACGGTCTCAG 120
S L W L L G T I L I L C S V D N H G L R

GAGATGTCTGATTTCCACAGACATGCACCATATAGAAGAGAGTTTCCAAGAAATCAAAAG 180
R C L I S T D M H H I E E S F Q E I K R

AGCCATCCAAGCTAAGGACACCTTCCCAAATGTCACTATCCTGTCCACATTGGGAGACTCT 240
A I Q A K D T F P N V T I L S T L E T L

GCAGATCATTAAAGCCCTTAGATGTGTGCTGCGTGACCAAGAACCTCCTGGCGTTCTACGT 300
Q I I K P L D V C C V T K N L L A F Y V

GGACAGGGTGTTCAAGGATCATCAGGAGCCAAACCCCAAATCTTGAGAAAAATCAGCAG 360
D R V F K D H Q E P N P K I L R K I S S

CATTGCCAACTCTTTCCTCTACATGCAGAAAACCTCTGCGGCAATGTCAGGAACAGAGGCA 420
I A N S F L Y M Q K T L R Q C Q E Q R Q

GTGTCAGTGCAGGCAGGAAGCCACCAATGCCACCAGAGTCATCCATGACAACTATGATCA 480
C H C R Q E A T N A T R V I H D N Y D Q

GCTGGAGGTCCACGCTGCTGCCATTAAATCCCTGGGAGAGCTCGACGTCTTTCTAGCCTG 540
L E V H A A A I K S L G E L D V F L A W

GATTAATAAGAATCATGAAGTAATGCCTCAGCTTGATGACAAGGAACCTGTATAGTGAT 600
I N K N H E V M S S A

CCAGGGATGAACACCCCTGTGCGGTTTACTGTGGGAGACAGCCACCTTGAAGGGGAAG 660

GAGATGGGGAAGGCCCTTGCAGCTGAAAGTCCCACTGGCTGGCCTCAGGCTGTCTTATT 720

CCGCTTGAAAATAGCCAAAAAGTCTACTGTGGTATTTGTAATAAACTCTATCTGCTGAAA 780

GGGCCTGCAGGCCATCCTGGGAGTAAAGGGCTGCCTTCCCATCTAATTTATTGTGAAGTC 840

ATATAGTCCATGTCTGTGATGTGAGCCAAGTGATATCCTGTAGTACACATTGTACTGAGT 900

GGTTTTTCTGAATAAATTCATATTTTACCTATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 960

AAAAAA 966

FIG.1

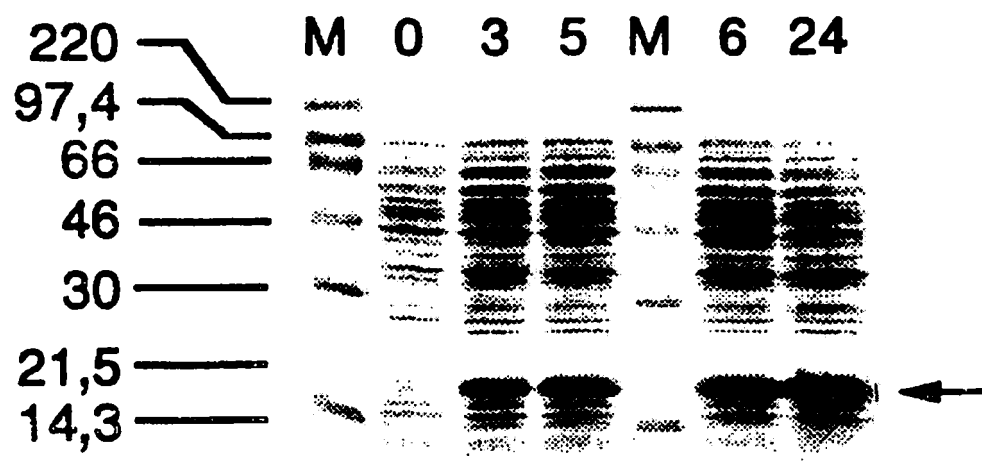


FIG.2

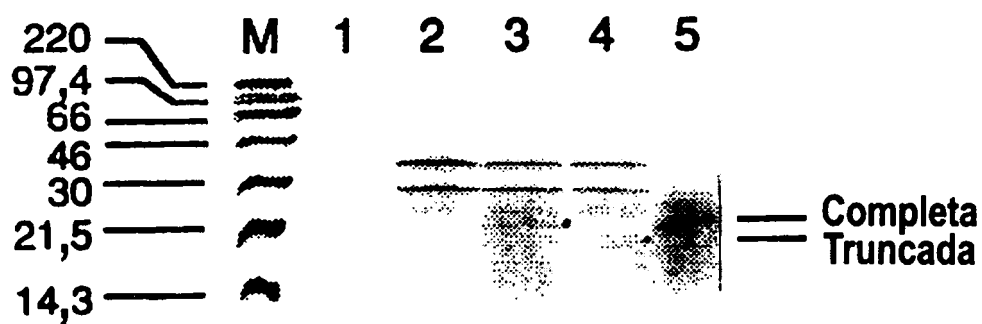


FIG.3

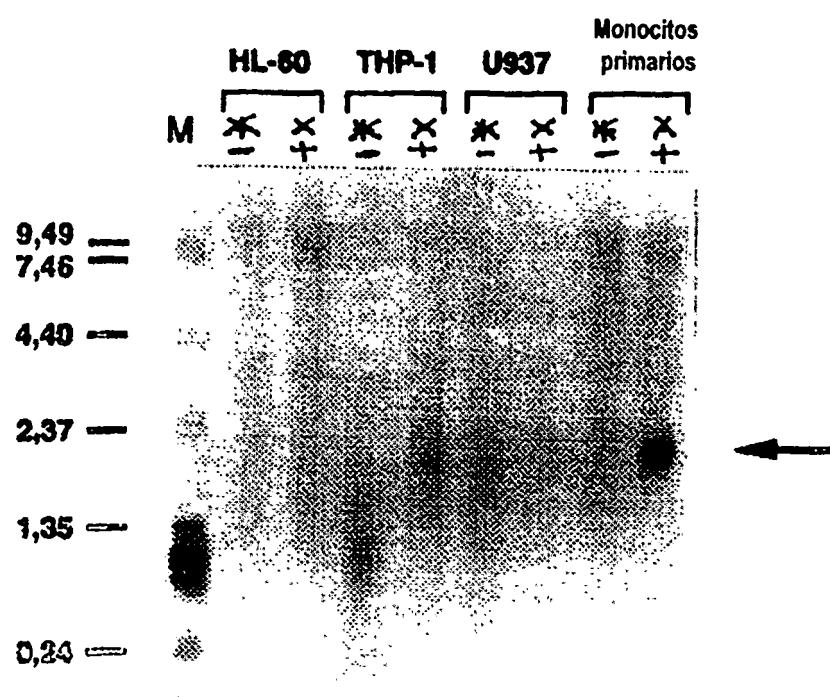


FIG.4

	1	11	21	31	41
hIL-10	MHSSALLC.C	LVLLTGVRA	SPGQGTQSEN	SCTHFPGNLP	NMLRDLRDAF
HMQBM23	MK...LQCVS	LWLLGTILI	LCSVDNHGLR	RCL.....IS	TDMHIEESF
Consenso	M---L-C-	L-LL-----	-----	-C-----	-----F
	51	61	71	81	91
hIL-10	SRVKTFFQMK	DQLDNLLKE	SL..LEDKFG	YLGCQALSEM	IQFYLEEVM
HMQBM23	QEIKRAIQAK	DTFPNVTILS	TLETLOIIP	LDVCCVTKNL	LAFYVDRVFK
Consenso	---K---Q-K	D---N-----	-L--L---K-	---C-----	--FY---V--
	101	111	121	131	141
hIL-10	QAENQDPDIK	AHVNSLGENL	KLRLRLRRC	HRFLPC...E	NKSKAVEQVK
HMQBM23	DHQEPNPKIL	RKISSIANSF	LYMOKTLRQC	QEQRQCHCRQ	EATNATRVIH
Consenso	-----P-I-	----S-----	-----LR-C	-----C----	----A-----
	151	161	171	181	
hIL-10	NAFNKLQ.EK	GIYKAMSEFD	IFINYIE.AY	MTMKIRN	
HMQBM23	DNYDQLEVHA	AAIKSLGELD	VFLAWINKNH	EVMSSA	
Consenso	-----L----	---K---E-D	-F---I-----	--M-----	

FIG.5

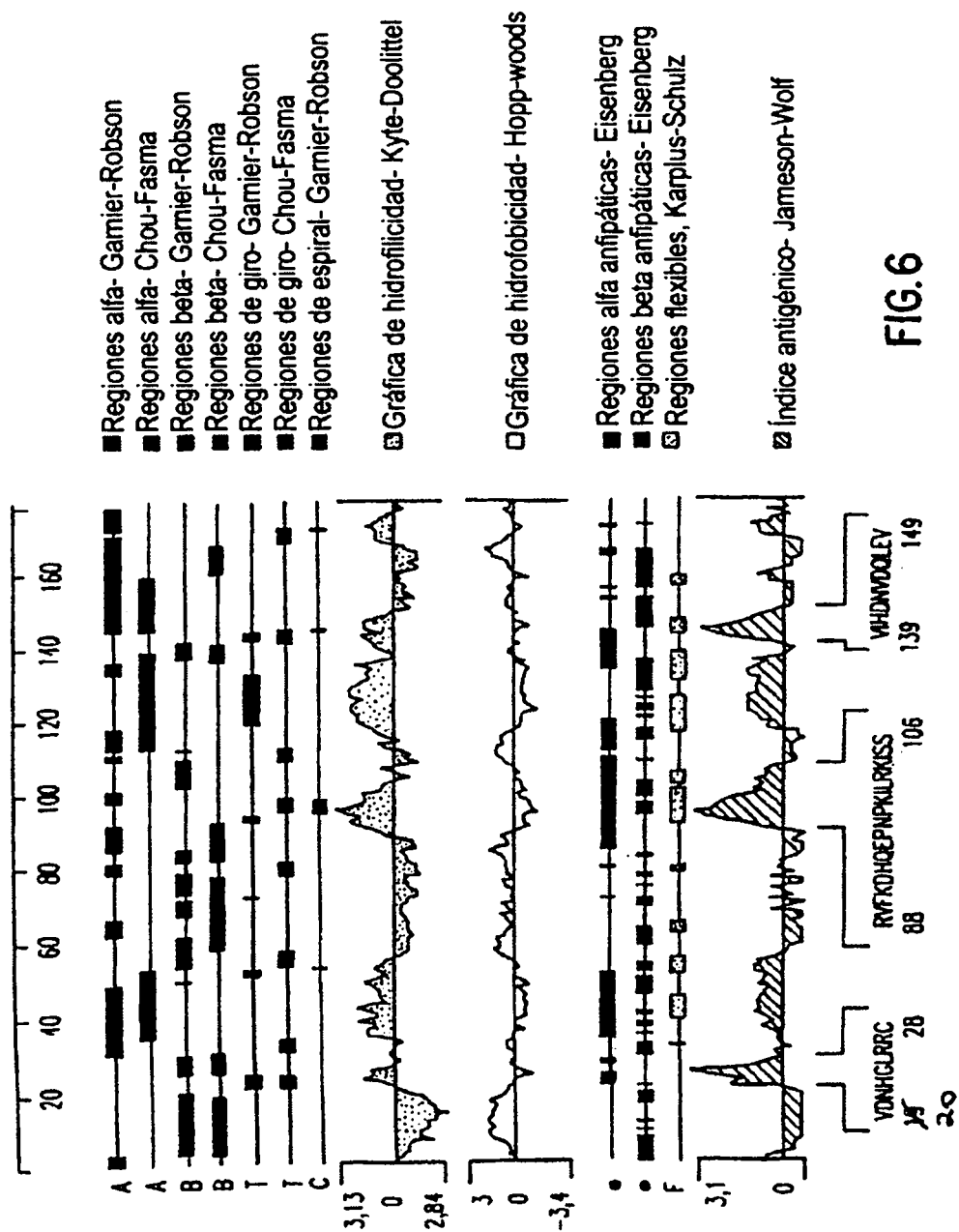


FIG. 6

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Human Genome Science, Inc.
9410 Key West Avenue
Rockville, MD 20850
Estados Unidos de América
- 10 SOLICITANTES/INVENTORES: Rosen, Craig, A.
Kenny, Joseph J.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: INTERLEUCINA 19
- 15 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 11
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox, P.L.L.C
- 20 (B) CALLE: 1100 New York Avenue, Suite 600
- (C) CIUDAD: Washington
- (D) ESTADO: DC
- (E) PAÍS: EE.UU.
- 25 (F) CÓDIGO POSTAL: 20005-3934
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- 30 (B) ORDENADOR: compatible con PC de IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión 1.30
- 35 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: por asignar
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 30 de agosto de 1996
- 40 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DE REPRESENTANTE/AGENTE
- (A) NOMBRE: Goldstein, Jorge A.
- 45 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 29.021
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 1488.041PC00
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 202-371-2600
- 50 (B) TELEFAX: 202-371-2540

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 966 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 60 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 44...574

ES 2 322 877 T3

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: sig_peptide

(B) LOCALIZACIÓN: 44...115

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide

(B) LOCALIZACIÓN: 116...574

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

```

GGCACGAGCA CAAGGAGCAG CCCGCAAGCA CCAAGTGAGA GGC ATG AAG TTA CAG      55
                                         Met Lys Leu Gln
                                         -24

TGT GTT TCC CTT TGG CTC CTG GGT ACA ATA CTG ATA TTG TGC TCA GTA      103
Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile Leu Cys Ser Val
-20                               -15                               -10                               -5

GAC AAC CAC GGT CTC AGG AGA TGT CTG ATT TCC ACA GAC ATG CAC CAT      151
Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr Asp Met His His
                               1                               5                               10

ATA GAA GAG AGT TTC CAA GAA ATC AAA AGA GCC ATC CAA GCT AAG GAC      199
Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile Gln Ala Lys Asp
                               15                               20                               25

ACC TTC CCA AAT GTC ACT ATC CTG TCC ACA TTG GAG ACT CTG CAG ATC      247
Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu Thr Leu Gln Ile
                               30                               35                               40

ATT AAG CCC TTA GAT GTG TGC TGC GTG ACC AAG AAC CTC CTG GCG TTC      295
Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn Leu Leu Ala Phe
45                               50                               55                               60

TAC GTG GAC AGG GTG TTC AAG GAT CAT CAG GAG CCA AAC CCC AAA ATC      343
Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro Asn Pro Lys Ile
                               65                               70                               75

TTG AGA AAA ATC AGC AGC ATT GCC AAC TCT TTC CTC TAC ATG CAG AAA      391
Leu Arg Lys Ile Ser Ser Ile Ala Asn Ser Phe Leu Tyr Met Gln Lys
                               80                               85                               90

ACT CTG CGG CAA TGT CAG GAA CAG AGG CAG TGT CAC TGC AGG CAG GAA      439
Thr Leu Arg Gln Cys Gln Glu Gln Arg Gln Cys His Cys Arg Gln Glu
                               95                               100                               105

GCC ACC AAT GCC ACC AGA GTC ATC CAT GAC AAC TAT GAT CAG CTG GAG      487
Ala Thr Asn Ala Thr Arg Val Ile His Asp Asn Tyr Asp Gln Leu Glu
110                               115                               120

GTC CAC GCT GCT GCC ATT AAA TCC CTG GGA GAG CTC GAC GTC TTT CTA      535
Val His Ala Ala Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Leu Asp Val Phe Leu
125                               130                               135                               140

GCC TGG ATT AAT AAG AAT CAT GAA GTA ATG TCC TCA GCT TGATGACAAG      584
Ala Trp Ile Asn Lys Asn His Glu Val Met Ser Ser Ala
145                               150

GAACCTGTAT AGTGATCCAG GGATGAACAC CCCCTGTGCG GTTTACTGTG GGAGACAGCC      644
CACCTTGAAG GGGAAGGAGA TGGGGAAGGC CCCTTGCAGC TGAAAGTCCC ACTGGCTGGC      704
CTCAGGCTGT CTTATTCCGC TTGAAAATAG CCAAAAAGTC TACTGTGGTA TTTGTAATAA      764
ACTCTATCTG CTGAAAGGCG CTGCAGGCCA TCCTGGGAGT AAAGGGCTGC CTTCCCATCT      824
AATTTATTGT GAAGTCATAT AGTCCATGTC TGTGATGTGA GCCAAGTGAT ATCCTGTAGT      884
ACACATTGTA CTGAGTGGTT TTTCTGAATA AATTCCATAT TTTACCTATG GAAAAA      944
AAAAA      AA
966

```

ES 2 322 877 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 177 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile
-24          -20          -15          -10

Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr
          -5              1              5

Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile
 10              15              20

Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu
 25              30              35              40

Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn
          45              50              55

Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro
          60              65              70

Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ser Ser Ile Ala Asn Ser Phe Leu
 75              80              85

Tyr Met Gln Lys Thr Leu Arg Gln Cys Gln Glu Gln Arg Gln Cys His
 90              95              100

Cys Arg Gln Glu Ala Thr Asn Ala Thr Arg Val Ile His Asp Asn Tyr
105              110              115              120

Asp Gln Leu Glu Val His Ala Ala Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Leu
          125              130              135

Asp Val Phe Leu Ala Trp Ile Asn Lys Asn His Glu Val Met Ser Ser
          140              145              150

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 322 877 T3

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

ACCTGAGGTC TGATGGCAAA GTCCAAGAAT

30

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

10

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

20

GGCATGCCAT GGAGTTACAG TGTGTTTCCC

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

25

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

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

35

GGAAGATCTA GCTGAGGACA TTAC

24

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

50

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

GGCGGGATCC CGCCATCATG AAGTTACAGT GTGTTTCCC

39

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

60

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 322 877 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

CCCAAGCTTG GTACCTCATC AAGCTGAGGA CATTAC

36

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

10

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

20

GGCGGGATCC CGCCATGAAG TTACAGTGTG TTTCCC

36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

25

(A) LONGITUD: 75 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

35

**CCCAAGCTTG GTACCTCATC AGAAAGCGTA GTCTGGGACG TCGTATGGGT
AAGCTGAGGA 60**

40

CATTACTTCA TGATT

75

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

55

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

GGCGGGATCC CGCCATCATG AAGTTACAGT GTGTTTCCC

39

60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

65

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 322 877 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

5 CCCAAGCTTG GTACCTCATC AAGCTGAGGA CATTAC

36

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65