



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 406**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/24** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00950787 .2**

96 Fecha de presentación : **27.07.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1200592**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

54 Título: **Citocinas de mamífero; reactivos relacionados.**

30 Prioridad: **30.07.1999 US 364674**  
**06.08.1999 US 369643**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.12.2009**

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

72 Inventor/es: **Timans, Jacqueline, C.;**  
**Kastelein, Robert, A. y**  
**Bazan, J., Fernando**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

**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

Citocinas de mamífero; reactivos relacionados.

5 Esta presentación reclama prioridad a las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente de cesión común USSN 09/364.674, presentada el 30 de julio de 1999; y USSN 09/369.634, presentada el 6 de agosto de 1999.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones relacionadas con proteínas, las cuales funcionan para controlar la biología y fisiología de células de mamíferos, por ejemplo, células del sistema inmune de un mamífero. En particular, proporciona genes purificados, proteínas, anticuerpos y reactivos relacionados útiles, por ejemplo, para regular la  
15 activación, desarrollo, diferenciación y función de varios tipos de células, incluyendo células hematopoyéticas.

**Antecedentes de la invención**

20 La tecnología de ADN recombinante se refiere en general a la técnica de integrar información genética de una fuente de donador en vectores para procesamiento subsecuente, tal como a través de introducción a un huésped, por lo que la información genética transferida se copia y/o expresa en el nuevo ambiente. Comúnmente la información genética existe en la forma de ADN complementario (ADNc) derivado de ARN mensajero (ARNm) que codifica para un producto de proteína deseada. El portador frecuentemente es un plásmido que tiene la capacidad de incorporar un  
25 ADNc para replicación posterior en un huésped y, en algunos casos, en realidad para controlar la expresión del ADNc y de esta manera dirigir la síntesis del producto codificado en el huésped.

Durante algún tiempo, se ha sabido que la respuesta inmune de mamíferos se basa en una serie de interacciones celulares complejas, denominadas la "red inmune". La investigación reciente ha proporcionado nuevas percepciones  
30 en el funcionamiento interno de esta red. Aunque permanece evidente que mucha de la respuesta, en realidad, tiene que ver con las interacciones de tipo red de linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, los inmunólogos ahora generalmente sostienen la opinión de que las proteínas solubles, conocidas como linfocinas, citocinas o monocinas, juegan un papel importante en el control de estas interacciones celulares. De esta manera, existe un considerable interés en el aislamiento, caracterización y mecanismos de acción de factores moduladores de célula, cuyo entendimiento  
35 conducirá a avances importantes en el diagnóstico y terapia de numerosas anomalías médicas, por ejemplo, trastornos del sistema inmune. Algunos de estos factores son factores de crecimiento hematopoyético y/o factores de diferenciación, por ejemplo, factor de células madre (SCF) o IL-11. Ver, por ejemplo, Mire-Sluis y Thorpe (ed. 1988) Cytokines Academic Press, San Diego; Thomson (ed. 1998) The Cytokine Handbook (3a. ed.). Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press; y Aggarwal y  
40 Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell.

Las linfocinas aparentemente median las actividades celulares en una variedad de formas. Han mostrado apoyar la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de células madre hematopoyéticas pluripotenciales en vastos números de progenitores comprendiendo diversos linajes celulares que forman un sistema inmune complejo. Las interacciones  
45 apropiadas y equilibradas entre los componentes celulares son necesarias para una respuesta inmune saludable. Los diferentes linajes celulares por lo general responden en una forma diferente cuando se administran linfocinas junto con otros agentes.

Los linajes celulares especialmente importantes para la respuesta inmune incluyen dos clases de linfocitos: células  
50 B, las cuales producen y secretan inmunoglobulinas (proteínas con la capacidad de reconocer y unirse a la materia extraña para efectuar su remoción), y células T de varios subconjuntos que secretan linfocinas e inducen o suprimen las células B y varias otras células (incluyendo otras células T) que forman la red inmune. Estos linfocitos interactúan con muchos otros tipos de célula.

Otro linaje celular importante es la célula cebada (que no se ha identificado positivamente en todas las especies de mamíferos), que es una célula de tejido conectivo que contiene gránulos localizada cerca de los capilares por todo el cuerpo. Estas células se encuentran especialmente en altas concentraciones en los pulmones, la piel, y tractos gastrointestinal y genitourinario. La células cebadas juegan un papel importante en trastornos relacionados con  
60 alergias, particularmente anafilaxis como sigue: cuando los antígenos seleccionados se entrecruzan con una clase de inmunoglobulinas unidas a receptores sobre la superficie de la célula cebada, la célula cebada se desgranula y libera mediadores, por ejemplo, histamina, serotonina, heparina y prostaglandinas, las cuales ocasionan reacciones alérgicas, por ejemplo, anafilaxis.

La búsqueda para entender mejor y tratar varios trastornos inmunes se ha visto obstaculizada por la incapacidad  
65 general para mantener células del sistema inmune *in vitro*. Los inmunólogos han descubierto que el cultivo de estas células puede lograrse a través del uso de sobrenadantes de células T u otros sobrenadantes de células, los cuales contienen varios factores de crecimiento, incluyendo muchas de las linfocinas.

A partir de lo anterior, es evidente que el descubrimiento y desarrollo de nuevas linfocinas, por ejemplo, relacionadas con IL-11, puede contribuir a nuevas terapias para una amplia variedad de condiciones degenerativas o anormales, las cuales directa o indirectamente involucran al sistema inmune y/o células hematopoyéticas. En particular, el descubrimiento y el desarrollo de linfocinas, que mejoran o potencian actividades benéficas de linfocinas conocidas, podría ser altamente ventajoso. La presente invención proporciona nuevas composiciones de interleucina y compuestos relacionados, y métodos para su uso.

### Breve descripción de la invención

La presente invención está dirigida a mamíferos, por ejemplo, roedores, caninos, felinos, primates, interleucina enumerada DNAX 80, o IL-D80 y sus actividades biológicas. Incluye ácidos nucleicos que codifica para los mismos polipéptidos y métodos para su producción y uso. Los ácidos nucleicos de la invención se caracterizan, en parte, por su homología a la secuencias de ADN complementario (ADNc) aquí descritas, y/o a través de ensayos funcionales para actividades de tipo de factor de crecimiento o de citocina, por ejemplo, IL-11 (ver Thomson (1998) The Cytokine Handbook 3a. ed., Academic Press, San Diego), aplicados a los polipéptidos, los cuales típicamente están codificados por estos ácidos nucleicos. Se proporcionan métodos para modular o intervenir en el control de fisiología dependiente de un factor de crecimiento o de una respuesta inmune.

La presente invención se basa en, en parte, el descubrimiento de nuevas secuencias de citocina que exhiben una similitud de secuencia y estructural significativa con IL-11. En particular, proporciona secuencias de primate, por ejemplo ser humano, y de roedor (por ejemplo de ratón). Los equivalentes funcionales que exhiben una homología secuencia importante estarán disponibles a partir de otros mamíferos, por ejemplo, vacas, caballos y ratas, ratones y especies que no son mamíferos.

En varias realizaciones de proteínas, la invención proporciona: un polipéptido substancialmente puro o aislado que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2, 4, 8, ó 10. También se describe en la presente memoria un polipéptido de IL-D80 substancialmente puro o recombinante que exhibe una identidad sobre una longitud de por lo menos aproximadamente 12 aminoácidos con la SEC ID N°: 2, 4, 8, ó 10. El polipéptido de la invención puede ser: una IL-D80 de secuencia natural de la SEC ID N°: 2, 4, 8, ó 10; o una proteína de fusión que comprende la secuencia de IL-D80 de SEC ID N°: 2, 4, 7, ó 10. También se describen en la presente memoria segmentos de identidad de por lo menos aproximadamente 14, 17, ó 19 aminoácidos. En otras realizaciones de la invención, la IL-D80 comprende una secuencia madura que comprende la secuencia de la Tabla 1; o exhibe un patrón de modificación posterior a la traducción distinto de la IL-D80 natural. Esta invención se refiere a un polipéptido de un animal de sangre caliente seleccionado de un mamífero, incluyendo un primate. También se describe en la presente memoria una IL-D80 que comprende por lo menos un segmento de polipéptido de la SEC ID N°: 2, 4, 8 ó 10; exhibe una pluralidad de fragmentos de residuos aminoácidos; es una variante alélica natural de IL-D80; tiene una longitud de por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos; exhibe por lo menos dos epítomos no solapantes, los cuales son específicos para una IL-D80 de primate; exhibe una identidad de secuencia sobre una longitud de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos con la IL-D80 de primate. En algunas realizaciones de la invención el polipéptido está es glicosilado; tiene un peso molecular de por lo menos 10 kD con glicosilación natural; es un polipéptido sintético; está unido a un sustrato sólido; está conjugado con otra porción química. También se describe en la presente memoria una IL-D80 con una sustitución de cinco veces o menor a partir de la secuencia natural; o que es una variante de eliminación o inserción de una secuencia natural. Las realizaciones preferidas de la invención incluyen una composición que comprende: un polipéptido de IL-D80 estéril; o el polipéptido de IL-D80 y un vehículo, en donde el vehículo es: un compuesto acuoso incluyendo agua, solución salina y/o regulador de pH; y/o se formula para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral. En realizaciones de proteína de fusión, la proteína puede tener: una secuencia de polipéptido maduro de la Tabla 1; una etiqueta de detección o purificación, incluyendo una secuencia de FLAG, His6 o Ig; y/o una secuencia de otra citocina o quimiocina, incluyendo una IL-11.

Las realizaciones de kit incluyen aquellas con un polipéptido IL-D80, y: un compartimento que comprende el polipéptido; y/o instrucciones para el uso o desecho de reactivos en el kit.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del mismo como se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se describen en la presente memoria compuestos de unión, en los que el compuesto puede tener un sitio de unión de antígeno de un anticuerpo, el cual se une específicamente a un polipéptido IL-D80 natural, en donde: la IL-D80 es una proteína de primate. El anticuerpo o fragmento de unión de la invención puede: ser un fragmento Fv, Fab o Fab2; conjugarse a otra porción química; desarrollarse contra una secuencia de péptido de una porción de polipéptido madura de la Tabla 1; desarrollarse contra una IL-D80 madura; desarrollarse contra una IL-D80 de primate purificada; inmunoseleccionarse; ser un anticuerpo policlonal; unirse a una IL-D80 desnaturalizada; exhibir un valor de Kd de por lo menos 30  $\mu$ M; unirse un sustrato sólido incluyendo una perla o membrana de plástico, estar en una composición estéril; o estar aceptablemente marcado, incluyendo una etiqueta radioactiva o fluorescente. Los kits que contienen compuestos de unión incluyen aquellos con: un compartimento que incluye el compuesto de unión; y/o instrucciones para el uso o desecho de reactivos en el kit. Por lo general, el kit es capaz de hacer un análisis cualitativo o cuantitativo.

Las composiciones preferidas comprenderán: un compuesto de unión estéril; o el compuesto de unión y un vehículo, en donde el vehículo es: un compuesto acuoso, incluyendo agua, solución salina, y/o regulador de pH; y/o se formulan para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

- 5 Las realizaciones de ácido nucleico incluyen un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un polipéptido IL-D80 que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2, 4, 8 ó 10 o una proteína de fusión. La IL-D80 puede ser de un primate; como también se describe en la presente memoria, el ácido nucleico puede codificar una secuencia de péptido antigénico de la Tabla 1; codificar una pluralidad de secuencias de péptido antigénico de la Tabla 1; exhibir una identidad con un ADNc natural que codifica el segmento. En algunas realizaciones, el ácido
- 10 nucleico puede: ser un vector de expresión; comprender además un origen de replicación; ser de una fuente natural; comprender una etiqueta detectable; comprender una secuencia de nucleótidos sintética; ser menor que 6 kb, preferiblemente menor que 3 kb; ser de un primate, incluyendo un ser humano; comprender una secuencia de codificación de longitud completa natural; ser una sonda de hibridación para un gen que codifica la IL-D80. También se describe en la presente memoria un cebador de PCR, producto de PCR o cebador de mutagénesis. La invención
- 15 también proporciona, una célula, tejido, u órgano aislado que comprende dicho ácido nucleico recombinante, y preferiblemente la célula será: una célula procariótica; una célula eucariótica; una célula bacteriana; una célula de levadura; una célula de insecto; una célula de mamífero; una célula de ratón; una célula de primate; o una célula humana.
- 20 Las realizaciones de kit incluyen aquellas con aquellos nucleicos y: un compartimento comprendiendo el ácido nucleico; un compartimento que incluye además la proteína o polipéptido IL-D80; y/o instrucciones para el uso o desecho de los reactivos en el kit. Típicamente, el kit es capaz de hacer un análisis cualitativo o cuantitativo.
- 25 También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que: hibridiza bajo condiciones de lavado de 30°C y menos de 2M de sal o de 45°C y/o 500 mM de sal, o 55°C y/o 150 mM de sal, con la SEC ID N°: 1, 3, 7 ó 9; o exhibe una identidad sobre una extensión de por lo menos aproximadamente 30, 55 ó 75 nucleótidos, con una IL-D80 de primate.
- 30 La invención abarca método para modular la fisiología o el desarrollo de una célula o células de cultivos de tejido, que comprende poner en contacto la célula con un agonista o antagonista de una IL-D80 de primate. El método puede ser cuando: el contacto es en combinación con un agonista o antagonista de IL-11; o el contacto es con un antagonista incluyendo una composición de unión que comprende un sitio de unión de anticuerpo que se une específicamente a una IL-D80.

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

### I. General

- 40 La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN que codifican varias proteínas de mamífero, las cuales son citocinas, por ejemplo, las cuales son moléculas secretadas que pueden mediar una señal entre células inmunes u otra células. Ver, por ejemplo, Paul (1997) Fundamental Immunology (3a. edición) Raven Press, N.Y. Las citocinas de longitud completa, y fragmentos o antagonistas, serán útiles en la modulación fisiológica de células que expresan un receptor. Probablemente, la IL-D80 tenga tanto efectos estimulantes como inhibidores
- 45 sobre las células hematopoyéticas, incluyendo, por ejemplo, células linfoides tales como células T, células B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos, etc.. Las proteínas también serán útiles como antígenos, por ejemplo, inmunógenos, para desarrollar anticuerpos contra varios epítomos sobre la proteína, tanto epítomos lineales como conformacionales.
- 50 Un ADNc que codifica IL-D80 se identificó a partir de varias secuencias de primate, por ejemplo, de ser humano, de BAC del cromosoma 16. Ver, por ejemplo, CIT987SK-A-575C2 y CIT987SK-A-761H5. La molécula se designó como huIL-D80. Se identificó y se describió una EST humana, la EST AI085007 humana. También se identificó y se describió una EST AA266872 de ratón.
- 55 El gen de primate, por ejemplo, de ser humano, codificará una pequeña proteína de tipo citocina soluble, de aproximadamente 216 aminoácidos (para la SEC ID N°: 2) o aproximadamente 243 aminoácidos (para la SEC ID N°: 8). Ver la Tabla 1 y SEC. ID. N°: 1, 2, 7 y 8. La IL-D80 exhibe motivos estructurales características de un miembro de las citocinas de cadena larga. Comparar, por ejemplo, las secuencias de IL-D80 e IL-11, disponibles de GenBank. También ver secuencias de roedor y Tabla 2 ó 3.
- 60

# ES 2 330 406 T3

TABLA 1

*Ácido nucleico (SEC ID N°: 1) que codifica IL-D80 de un primate, por ejemplo, de un ser humano*

cactggccacgctgaagataggggacttgagttccagtcttctctctgctaccgaccggctttgtgacett  
 gaacaagacttccccctctgattccatcctcatgtcacatctgaagcctccaacttctgtcactgagctca  
 ggattcccaggcaagcccacggagtgccccacaggggtcagagccgtaaCAGGACTTGGAAAATAACCCGAAA  
 ATTGGGCTCAGCCTGTTGCTGCTTCCCTTGCTCCTGGTTCAAGCTGGTGTCTGGGGATTCCCAAGGCCCCCA  
 GGGAGGCCCCAGCTGAGCCTGCAGGAGCTGCGGAGGGAGTTACAGTCAGCCTGCATCTCGCCAGGAAGCTG  
 CTCTCCGAGGTTCCGGGGCCAGGCCACCGCTTTGCGGAATCTCACCTGCCAGGAGTGAACCTGTACCTCCTG  
 CCCCTGGGAGAGCAGCTCCCTGATGTTTCCCTGACCTTCCAGGCCTGGCGCCGCTCTCTGACCCGGAGCGT  
 CTCTGCTTCATCTCCACCACGCTTCAGCCCTTCCATGCCCCGCTGGGAGGGCTGGGGACCCAGGGCCGCTGG  
 ACCAACATGGAGAGGATGCAGCTGTGGGCCATGAGGCTGGACCTCCGCGATCTGCAGCGGCACCTCCGCTTC  
 CAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAACCTCCCGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 AAGGGGCTGCTCCAGGGGCACTGGGCAGCGCCTTACAGGGCCCGGCCAGGTGTCTGGGCCCAGCTCCTC  
 TCCACCTACCGCTGCTGCACTCCTTGGAGCTCGTCTTATCTCGGGCCGTGCGGGAGTTGCTGCTGCTGTCC  
 AAGGCTGGGCACTCAGTCTGGCCCTTGGGGTTCCCAACATTGAGCCCCCAGCCCTGAtcgggtggcttcttag  
 cccctcgccccccaccctttagaactttaggactggagtcttggcatcagggcagccttcgcatcatcagcc  
 ttggacaaggaggaggctcttccagccccctgccccaggccctaccagtaactgaaagccccctctgggtcctc  
 gccagctattttatttcttggatatattttatttattgtttagggagatgatgggtttattttattgtcttggggccc  
 qatggctcctcctcgggccaagcccccatgctgggtgcccataaagcactctcatccaaaa

Los límites de exón probablemente corresponden a aproximadamente 219/220; 393/394; 492/493; y 551/552. Los segmentos de codificación que corresponden a aquellos límites son de particular interés. La secuencia de aminoácidos traducida 193 a 918 es la SEC ID NO: 2.

QDLENNPKIGLSLLLLPLLLVQAGVWGFPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLARKLLSEVRGQAHRF AESH  
 L PGVNL YLLPLGEQLPDVSLTPQAWRRLS DPERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQGRWTNMERMQLWAMRLDLR  
 DLQRHLRFQVLAAGFNLPEEEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPAQVSWPQLLSTYRLLHSLELVL SRA  
 VRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP

Sitio de escisión de señal pronosticado entre... VWG y FPR...; los límites de la hélice A entre aproximadamente... GRP y QLS... a entre aproximadamente... RKL y LSE...; los límites de la hélice B entre aproximadamente... QLP y DVS... a entre aproximadamente... TLQ y PFH...; los límites de la hélice C entre aproximadamente... GLG y TQG... a entre aproximadamente... VLA y AGF...; y los límites de la hélice D entre aproximadamente... STY y RLL... a entre aproximadamente... HSV y WPL... Los solicitantes intentan descartar emparejamientos de secuencia con residuos altamente repetidos por ejemplo, las repeticiones L y E (13-20, 220-223, y 163-175), y los segmentos de codificación correspondientes.

## ES 2 330 406 T3

Ácido nucleico (SEC ID NO: 7) que codifica una variante de IL-D80 a partir de un primate, por ejemplo, un ser humano (observar que la secuencia de no codificación es igual a aquella en SEC ID N°: 1 pero se ha dejado aquí para aclaración).

```

ATGGGCCAGACGGCAGGCGACCTTGGCTGGCGGCTCAGCCTGTTGCTGCTTCCCTTGCTCCTGGTTCAAGCT
GGTGTCTGGGGATTCCCAAGGCCCCCAGGGAGGCCCCAGCTGAGCCTGCAGGAGCTGCGGAGGGAGTTCACA
GTCAGCCTGCATCTCGCCAGGAAGCTGCTCTCCGAGGTTCCGGGGCCAGGCCACCGCTTTGCGGAATCTCAC
CTGCCAGGAGTGAACCTGTACCTCCTGCCCCCTGGGAGAGCAGCTCCCTGATGTTTCCCTGACCTTCCAGGCC
TGGCGCCCGCTCTCTGACCCGGAGCGTCTCTGCTTCATCTCCACCACGCTTCAGCCCTTCCATGCCCCGCTG
GGAGGGCTGGGGACCCAGGGCCGCTGGACCAACATGGAGAGGATGCAGCTGTGGGCCATGAGGCTGGACCTC
CGCGATCTGCAGCGGCACCTCCGCTTCCAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAACCTCCCGAGGAGGAGGAGGAG
GAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGGGCTGCTCCCAGGGCACTGGGCAGCGCCTTACAGGGCCCCG
GCCAGGTGCTCTGGCCCCAGCTCCTCTCCACCTACCGCCTGCTGCACTCCTTGGAGCTCGTCTTATCTCGG
GCCGTGCGGGAGTTGCTGCTGCTGTCCAAGGCTGGGCACTCAGTCTGGCCCTTGGGGTTCCCAACATTGAGC
CCCCAGCCCTGA

```

La secuencia de aminoácidos traducida en la SEC ID N°: 8:

```

MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGVWGFFRPPGRPQLSLQELRREFTVSLHLARKLLSEVRGQAHRAESH
LPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRLSDPERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQGRWTNMERMQLWAMRLDL
RDLQRHLRFQVLAAGFNLPEEEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPQVSWPQLLSTYRLLHSLELVLSR
AVRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP

```

Sitio de escisión de señal pronosticado entre... VWG y FPR...; los límites de la hélice A entre aproximadamente... GRP y QLS... a entre aproximadamente... RKL y LSE...; los límites de la hélice B entre aproximadamente... QLP y DVS... a entre aproximadamente... TLQ y PFH...; los límites de la hélice C entre aproximadamente... GLG y TQG... a entre aproximadamente... VLA y AGF...; y los límites de la hélice D entre aproximadamente... STY y RLL... a entre aproximadamente... HSV y WPL... Los solicitantes intentan descartar emparejamientos de secuencia con residuos altamente repetidos por ejemplo, las repeticiones L y E (13-20, 220-223, y 163-175), y los segmentos de codificación correspondientes.

Comparación de las SEC ID N°: 2 y 8:

```

2      1  QDLENNPKIGLSLLLLPLLLVQAGVWGFFRPPGRPQLSLQELRREFTVS  49
8      1  MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGVWGFFRPPGRPQLSLQELRREFTVS  50
      *****

2      50  LHLARKLLSEVRGQAHRAESHLPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRL  99
8      51  LHLARKLLSEVRGQAHRAESHLPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRL 100
      *****

2     100  SDPERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQGRWTNMERMQLWAMRLDLRDLQRH 149
8     101  SDPERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQGRWTNMERMQLWAMRLDLRDLQRH 150
      *****

2     150  LRFQVLAAGFNLPEEEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPQVSWPQL 199
8     151  LRFQVLAAGFNLPEEEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPQVSWPQL 200
      *****

2     200  LSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP 242
8     201  LSTYRLLHSLELVLSRAVRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP 243
      *****

```

ES 2 330 406 T3

Ácido nucleico (SEC ID N°: 3) que codifica IL-D80 de un roedor, por ejemplo, ratón.

5 nccaagntggtacgcctgcaggtaccggtccgggaattccggggtcgacccacgcgtccggggccaggtgaca  
ggagacnttgagctggcgaggactggacaggcaacctggccaggagcaggactaaacagacaaatgaagagtg  
tagagggaaggcttgagaaccgaggacagtcagaggaacggcacaggggagctGGGCTCAGCCTGTTGCTG  
CTACCCCTTGCTTCTGTTACAAGCTGGTTCTCTGGGGGTTCCCAACAGACCCCCTGAGCCTTCAAGAGCTGCGC  
10 AGGGAATTACAGCTCAGCCTGTACCTTGCCAGGAAGCTGCTCTCTGAGGTTCAGGGCTATGTCCACAGCTTT  
GCTGAATCTCGATTGCCAGGAGTGAACCTGGACCTCCTGCCCCCTGGGATACCATCTTCTTAATGTTTCCCTG  
ACTTTCAGGCATGGCATCACCTCTCTGACTCTGAGAGACTCTGCTTCTCTCGCTACCACACTTCGGCCCTTC  
CTTGCCATGCTGGGAGGGCTGGGGACCCAGGGGACCTGGACCAACATCAAGAGGATGCAGCAATGGAGACTC  
TCTCTGTTTCTTGATGTGGCCCTGTGTGTCTTTGCTCACAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAAATGTTCAAAG  
15 GAGGAGGAGGACAAGGAGGAAGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAAAGAAAGCTGCCCTAGGGCGTCTGGGT  
GGCCCCAATCAGGTGTCAATCCAAGTGTCTGGCCCCAGCTGCTCTATACCTACCAGCTCCTTCACTCCATG  
GAGCTTGCTCTGTCTCGGGCTGTTCTGGGACCTGCTGCTGCTGTCCCTGCCAGGCGCCAGGCTCAGCCTTG  
GAGTTCCTAACACCTAGCTTCAAGCCCTGAtggagtgaacctccagctccctccctcgcccgtaaagactct  
20 aaggctggagtctggccaatcacaggacaggctctagctcgtttgcttagaccaggcagggtttcactagc  
tccagccctgacccaataatttaaagccctccagctccttaccagatattttatttcttggaattttattta  
tttttaagaaatggttta

<sup>25</sup> Límites de exón de aproximadamente 198/199; 360/361; 459/460; y 618/619. Son particularmente interesantes segmentos de codificación correspondientes a esos límites. La secuencia de aminoácidos traducida de 199 a 891 es la SEC ID N°: 4.

30

35 GLSLLLLPLLLVQAGSWGFPDPLSLQELRREFTVSLYLARKLLSEVQGYVHSFAESRLPGVNLDLLPLGYH  
LPNVSLTFQAWHILSDSERLCFLATTLRPFLAMLGGLGTQGTWNTNIKRMQWRLSLVLDVALCVFRSQVLAA  
GFKCSKEEEDKEEEEEEEEEKKLPLGRLGGPNQVSSQVSWPQLLYTYQLLHSMELVLSRAVRDLLLLSLPR  
RPGSALEFLTSPFKP

40 Sitio de escisión de señal pronosticado entre... VWG y FPR...; los límites de la hélice A entre aproximadamente... GRP y QLS... a entre aproximadamente... RKL y LSE...; los límites de la hélice B entre aproximadamente...QLP y DVS... a entre aproximadamente... TLQ y PFH...; los límites de la hélice C entre aproximadamente... GLG y TQG... a entre aproximadamente... VLA y AGF...; y los límites de la hélice D entre aproximadamente... STY y RLL... a entre aproximadamente... HSV y WPL... Los solicitantes intentan descartar emparejamientos de secuencia con residuos  
45 altamente repetidos por ejemplo, las repeticiones L y E (13-20, 220-223, y 163-175), y los segmentos de codificación correspondientes.

IL-D80 de roedor variante, por ejemplo, ratón (SEC ID N°:9).

50

ATGGGCCAGACGGCAGGCGACCTTGGCTGGCGGCTCAGCCTGTGCTGCTACCCCTTGCTTCTGGTACAAGCT  
GGTTCTTGGGGGTTCCCAACAGACCCCCTGAGCCTTCAAGAGCTGCGCAGGGAATTCACAGTCAGCCTGTAC  
CTTGCCAGGAAGCTGCTCTCTGAGGTTTCAAGGCTATGTCCACAGCTTTGCTGAATCTCGATTGCCAGGAGTG  
AACCTGGACCTCTCTGCCCCGAGGATACCATCTTCCCAATGTTTCCCTGACTTTCCAGGCATGGCATCACCTC  
TCTGACTCTGAGAGACTCTGCTTCTCTCGCTACCAACTTCGGCCCTTCCCTGCCATGCTGGGAGGGCTGGGG  
ACCCAGGGGACCTGGACCAGCTCAGAGAGGGAGCAGCTGTGGGCCATGAGGCTGGATCTCCGGGACCTGCAC  
AGGCACCTCCGCTTTTCAAGTGCTGGCTGCAGGATTCAAATGTTCAAAGGAGGAGGAGGACAAGGAGGAAGAG  
GAAGAGGAGGAAGAAGAAGAAAAGAAGCTGCCCCCTAGGGGCTCTGGGTGGCCCCAATCAGGTGTCATCCCAA  
GTGTCCTGGCCCCAGCTGCTCTATACCTACCAGCTCCTTCACTCCCTGGAGCTTGTCTGTCTCGGGCTGTT  
CGGGACCTGCTGCTGCTGTCCCTGCCAGGCGCCAGGCTCAGCCTGGGATTCTTAACacctaagcttcaagc  
cctatggagtgaccttcagctccctccctcgcccgtaagactctaaggctggagctctggccaatcacagg  
acaggctctagctcgtttgcttagaccaggcagggcttactagctcccagccctgacccaataattttaa  
agccctccagtccttaccagatatatttcttggaatatttatttttaagaaatggtttatttattgt  
ttcactcttgaagttaggccaccatgctgggtgcctaataaagccatccagccgg

# ES 2 330 406 T3

Traducción de 1-702; IL-D80 de roedor, por ejemplo, ratón (SEC ID N°: 10)

```

MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGSWGFPDPLSLQELRREFTVSLYLARKLLSEVQGYVHSFAESRLPGV
NLDLLPLGYHLPNVSLTFQAWHHLSDSERLCFLATTLRPFPAMLGGLGTQGTWTSSEREQLWAMRLDLRDLH
RHLRFQVLAAGFKCSKEEEDKEEEEEEEEEEEKKLPLGALGGPNQVSSQVSWPQLLYTYQLLHSLELVLRAV
RDLLLLSLPRRPGSAWDS

```

Comparación de las SEC ID N°: 4 y 10:

```

10      1 MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGSWGFPDPLSLQELRREFTVSLYLA  50
4        1          GLSLLLLPLLLVQAGSWGFPDPLSLQELRREFTVSLYLA  40
          *****

10      51 RKLLSEVQGYVHSFAESRLPGVNLDDLPLGYHLPNVSLTFQAWHHLSDSE 100
4        41 RKLLSEVQGYVHSFAESRLPGVNLDDLPLGYHLPNVSLTFQAWHHLSDSE  90
          *****

10     101 RLCFLATTLRPFPAMLGGLGTQGTWTSSEREQLWAMRLDLRDLHRHLRFQ 150
4        91 RLCFLATTLRPFLAMLGGLGTQGTWTNKRMQQWRLSLVLDVALCVFRSQ 140
          ***** * * * * *

10     151 VLAAGFKCSKEEEDKEEEEEEEEEEEKKLPLGALGGPNQVSSQVSWPQLLY 200
4        141 VLAAGFKCSKEEEDKEEEEEEEEEEEKKLPLGRLGPNQVSSQVSWPQLLY 190
          *****

10     201 TYQLLHSLELVLRAVRDLLLLSLPRRPGSAWDS          234
4        191 TYQLLHSMELVLRAVRDLLLLSLPRRPGSALEFLTPSFKP 231
          *****

```



# ES 2 330 406 T3

TABLA 2

Comparación de varias realizaciones de IL-11 con la IL-D80. La IL-11 humana es la SEC ID N°: 5;  
la IL-11 de ratón es la SEC ID N°: 6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

```

hIL-11    ---MNCVCRLVLVVLVSLWPD TAVAPGPPPGP--P-RVSPDPRAELDSTVL
mIL-11    ---MNCVCRLVLVVLVSLWPD RVVAPGPPAGS--P-RVSSDPRADLDSAVL
hIL-D80    DLENNPKIGLSLLLLPLLLVQAGVWGFPRPPGRPQLSLQELRREFTVSLH
mIL-D80    -----GLSLLLLPLLLVQAGSWGFP TDP----LSLQELRREFTVSLY
           * * : : * . * * . : * : : :

hIL-11    LTRSLLADTRQLAAQLRDK-FPADGDHNLDS---LPTLAMSAGALGALQL
mIL-11    LTRSLLADTRQLAAQMRDK-FPADGDHSLDS---LPTLAMSAGTLGSLQL
hIL-D80    LARKLLSEVRGQAH RFAESHLPGVNLYLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRLSD
mIL-D80    LARKLLSEVQGYVHSFAESRLPGVNLDLLPLGYHLPNVSLTFQAWHHLSD
           * : * . * * : : : . : : : * . * * : : : : * .

hIL-11    PGVLTRLRADLLSYLRHVQWLRRAG-GSSLKTLEPELGT LQARLDRLRRR
mIL-11    PGVLTRLRVDLMSYLRHVQWLRRAG-GPSLKTLEPELGALQARLERLLRR
hIL-D80    PERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQGRWTNMERMQLWAMRLDLRLDQRHLR
mIL-D80    SERLCFLATTLRPF LAMLGGLGTQGTWTNIKRMQQWRLSLVLDVALCVFR
           . * : . * : : : * * . : : : : * *

hIL-11    LQLLMSRLALPQPPPD-----P-----PAPPLAPP-----SSAWGGI
mIL-11    LQLLMSRLALPQAAPD-----Q-----PVIPLGPP-----ASAWGSI
hIL-D80    FQVLAAGFNLPEEEE--EEEEEEEEERKGLLPGALGSALQGPQVSWPQL
mIL-D80    SQVLAAGFKCSKEEEDKEEEEEEEEEEEKKLPLGRLGGPNQVSSQVSWPQL
           * : * : : : : * . . : * :

hIL-11    RAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLLLKTRL-----
mIL-11    RAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLLLLKTRL-----
hIL-D80    LSTYRLLSLELVLSRAVRELLLLSKAGHSVWPLGFPTLSPQP
mIL-D80    LYTYQLLSMELVL SRAVRDLLLLSLPRRPGSALEFLTSPFKP
           : : : * . : : * . * * * * * .

```

La comparación de las secuencias también proporcionará un árbol evolutivo. Este puede generarse, por ejemplo, utilizando el programa TreeView en combinación con el programa de software de análisis ClutalX. Ver, Thompson y otros, Nuc. Acids Res. 25:4876-4882; y TreeView, Page, IBL, Universidad de Glasgow, correo electrónico rpa-ge@bio.gla.ac.uk; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

65

TABLA 3

Comparación adicional de varias realizaciones de IL-11 con IL-D80 de primate (SEC ID N°: 8 en lugar de SEC ID N°: 2 como en la Tabla 2) y IL-D80 de roedor (SEC ID N°: 10 en lugar de SEC ID N°: 4 como en la Tabla 2).

La IL-11 de primate, por ejemplo, ser humano es la SEC ID N°: 5; la IL-11 de roedor, por ejemplo, ratón es la SEC ID N°: 6. La alineación con IL-11 utilizando el programa de alineación de secuencia múltiple CLUSTAL X (1.4b)

```

10 huIL-11      -----MNCVCRLVLVVLSSLWPD TAVAPGPPPGP--P-RVSPDPRAELDST
moIL-11      -----MNCVCRLVLVVLSSLWPDRV VAPGPPAGS--P-RVSSDPRADLDSA
huIL-D80     MGQTAGDLGWRLSLLLLPLLLVQAGVWGFP RPPGPRQLSLQELRREFTVS
moIL-D80     MGQTAGDLGWGLSLLLLPLLLVQAGS WGFPTDF---LSLQELRREFTVS
15          :. . * *::*. * . * * . : : : * :: :

huIL-11      VLLTRSLLADTRQLAAQLRDK-FPADGDH NLDS---LPTLAMSAGALGAL
moIL-11      VLLTRSLLADTRQLAAQMRDK-FPADGDH SLDS---LPTLAMSAGTLGSL
20 huIL-D80     LHLARKLLSEVRGQAH RFAESHLPGVNL YLLPLGEQLPDVSLTFQAWRRL
moIL-D80     LYLARKLLSEVQGYVH SFAESRLPGVNL DLLPLGYHLPNVSLTFQAWHHL
          : * : *. * * : : : . : : : : * . * : * * : : : : : *

25 huIL-11      QLPGVLTRLRADLLSYLRHVQW LRRAG-GSSLKTLPELGLTLQARLDRLL
moIL-11      QLPGVLTRLRVDLMSYLRHVQW LRRAG-GPSLKTLPELGLALQARLERLL
huIL-D80     SDPERLCFISTTLQPFHAPLGGLGTQ GRWTNMERMQLWAMRLDLRLQRH
30 moIL-D80     SDSERLCFLATTLRPFLAMLGGLGTQ GTWTN IKRMQQWRLSLVLDVALCV
          . . * : . * . : : * * . . : : : *

huIL-11      RRLQLLMSRLALPQPPPD-----PPAPPLAPP-----SSAWG
35 moIL-11      RRLQLLMSRLALPQAAPD-----QPVIPLGPP-----ASAWG
huIL-D80     LRFQVLAAGFNLPEEEEE--EEEEEEEEER KGLLP GALGSALQGPAQVSWP
moIL-D80     FRSQVLAAGFKCSKEEEDKEEEEEEEEE EKKLPLGRLGGPNQVSSQVSWP
40          * * : : . : : : : : : : : * . . : : *

huIL-11      GIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGL LLLLKTRL-----
moIL-11      SIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGL LLLLKTRL-----
45 huIL-D80     QLLSTYRLLSLELVL SRAVRELLLLSKAGHS VWPLGFPTLSPQP
moIL-D80     QLLYTYQLLSMELVLSRAVRD LLLLSLPRRPGSALEFLTSPFKP
          : : : * . : *. * . * * * * * . : . . :

```

Como antes, la comparación de las secuencias también proporcionará un árbol evolutivo. Este puede generarse, por ejemplo, utilizando el programa TreeView en combinación con el programa de software de análisis ClustalX. Ver, Thompson, y otros, Nuc. Acids Res. 25: 4876-4882; y TreeView, Page, IBLS, Universidad de Glasgow, correo electrónico rpage@bio.gla.ac.uk; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

La homología estructural de IL-D80 con proteínas de citocinas relacionadas sugiere una función relacionada de esta molécula. La IL-D80 es una citocina de cadena larga exhibe una similitud de secuencia con IL-11.

Muchos aspectos de la biología de IL-11 son bien reconocidos. Ver, por ejemplo, Sonis y otros (1999) Leukimia 13:831-834; Jacques y otros, (1998) Res. Immunol. 149: 737-740; Trepicchi, y otros, (1998) Ann N.Y. Acad. Sci. 856: 12-21; Jacobson (1998) in Thomson The Cytokine Handbook, Academic Press; Maslak y otros, (1998) Semin. Hematol. 35: 253-60; Leng y otros (1997) Int. J. Biochem. Cell. Biol. 29:1059 -1062; Du y otros (1997) Blood 89: 3897-3908; Goldman (1995) Stem Cells 13: 462-471; y Du y otros (1995) Curr. Opin. Hematol. 2: 182-188. La biología de la IL-D80 se espera que sea similar, por ejemplo, algunas de las actividades biológicas se pueden solapar.

Los agonistas, o los antagonistas, de IL-D80 también pueden actuar como antagonistas funcionales o del receptor, por ejemplo, los cuales bloquean la unión de IL-11 a sus receptores respectivos, o median las acciones opuestas. De esta manera, la IL-D80 o sus antagonistas, pueden ser útiles en el tratamiento de condiciones médicas anormales, incluyendo trastornos inmunes, por ejemplo, deficiencias inmunes de células T, inflamación crónica o rechazo de

tejido, o en condiciones cardiovasculares o neurofisiológicas. Por lo general se utilizarán composiciones que combinen la IL-D80 y reactivos relacionados con IL-11.

Los antígenos naturales son capaces de mediar varias respuestas bioquímicas que conducen a respuestas biológicas o fisiológicas en células objetivo. La realización preferida caracterizada en la presente es de ser humano, pero existen otros homólogos de primate u otras especies por naturaleza. Las secuencias adicionales para proteínas en otras especies de mamíferos, por ejemplo, primates, caninos, felinos y roedores, también deberían estar disponibles, particularmente las especies animales domésticas. Ver más adelante. Las descripciones que siguen están dirigidas, para propósitos ilustrativos, a una IL-D80 humana, pero asimismo son aplicables a realizaciones relacionadas de otras especies.

## II. IL-D80 purificada

En varias realizaciones se muestra una secuencia de aminoácidos de IL-D80 de primate, por ejemplo, de ser humano, por ejemplo las SEC ID N°: 2, 4, 8, o 10. Otros ácidos técnicos de existencia natural que codifican la proteína, pueden aislarse a través de procedimientos estándares utilizando la secuencia provista, por ejemplo, técnicas de PCR o a través de hibridación. Estas secuencias de aminoácidos, proporcionadas de amino a carboxi, son importantes para proporcionar información de secuencia para la citocina permitiendo distinguir el antígeno proteico de otras proteínas e ilustrando numerosas variantes. Sin embargo, las secuencias peptídicas permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos para reconocer tales segmentos, y las secuencias de nucleótidos permiten la preparación de sondas oligonucleotídicas, siendo ambas estrategias para la detección o aislamiento, por ejemplo, clonación de genes que codifican tales secuencias.

Como se utiliza en la presente, el término "IL-D80 soluble humana" debe abarcar, cuando se utilizan en el contexto de una proteína, una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos que corresponda a un polipéptido soluble mostrado en la SEC ID N°: 2 u 8, o sus fragmentos importantes. También se describen en la presente memoria una pluralidad de distintos segmentos por ejemplo, no solapantes, de la longitud especificada. Típicamente, la pluralidad será por lo menos 2, muy usualmente por lo menos 3, y preferiblemente 5, 7 o aún más. Aunque se proporcionan la longitud mínima, pueden ser apropiadas longitudes más largas y de varios tamaños, por ejemplo, una de una longitud de 7 y dos de una longitud de 12.

Los componentes unión, por ejemplo, los anticuerpos, típicamente se unen a una IL-D80 con una alta afinidad, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 100 nM, usualmente mejor que aproximadamente 30 nM, preferiblemente mejor que aproximadamente 10 nM, y muy preferiblemente mejor que aproximadamente 3 nM. Las proteínas homólogas se encontrarán en especies de mamíferos distintas al ser humano, por ejemplo, otros primates, ungulados o roedores. Las especies que no son de mamíferos también deberían poseer genes y proteínas estructural o funcionalmente relacionados, por ejemplo, aves o anfibios.

También se describen en la presente memoria polipéptidos que incluyen un fragmento o segmento importante, y abarcan una extensión de residuos aminoácidos de por lo menos aproximadamente ocho aminoácidos, en general por lo menos aproximadamente doce aminoácidos, típicamente por lo menos aproximadamente 16 aminoácidos, de preferencia por lo menos aproximadamente veinte aminoácidos y con realizaciones particularmente preferidas, por lo menos aproximadamente 30 o más aminoácidos, por ejemplo, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 100, etcétera. Dichos fragmentos pueden tener extremos que comiencen y/o finalicen prácticamente en todas las posiciones, por ejemplo, que comiencen en los residuos 1, 2, 3, etc. y terminen en, por ejemplo, 150, 149, 148, etcétera, en todas las combinaciones prácticas. Los péptidos particularmente de interés tienen extremos que corresponden a límites de dominio estructural, por ejemplo, hélices, A, B, C y/o D. Ver Tablas 1, 2 y 3.

El término "composición de unión" se refiere a moléculas que se unen con un carácter específico a IL-D80, por ejemplo, en una interacción de anticuerpos-antígenos. El carácter específico puede ser más o menos inclusivo, por ejemplo, específico a una realización particular, o grupos de realizaciones relacionadas, por ejemplo, primates, roedores, etcétera. También incluye compuestos, por ejemplo, proteínas que específicamente se asocian con IL-D80, incluyendo una interacción de proteína-proteína fisiológicamente importante, natural, ya sea, covalente o no covalente. La molécula puede ser un polímero, o reactivo químico. Un análogo funcional puede ser una proteína con modificaciones estructurales o puede ser una molécula que tenga una forma molecular que interactúe con los determinantes de unión apropiados. Los compuestos pueden servir como agonistas o antagonistas de una interacción de unión a receptor, ver, por ejemplo, Goodman, y otros (eds.) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (edición actual) Pergamon Press.

Substancialmente puro por ejemplo, en un contexto de proteína, típicamente significa que la proteína está libre de otras proteínas de contaminación, ácidos nucleicos, u otros ingredientes biológicos derivados del organismo de fuente original. La pureza puede analizarse a través de métodos estándares, típicamente en peso, y ordinariamente será por lo menos aproximadamente 40% pura, en general por lo menos aproximadamente 50% pura, por lo general por lo menos aproximadamente 60% pura, típicamente por lo menos aproximadamente 80% pura, de preferencia por lo menos aproximadamente 90% pura y en realizaciones muy preferidas, por lo menos 95% pura. Por lo general se pueden agregar vehículos o excipientes.

La solubilidad de un polipéptido un fragmento depende del ambiente y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad del polipéptido, incluyendo temperatura, ambiente de electrolito, tamaño y características moleculares

del polipéptido y naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a la cual el polipéptido se utiliza varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 65°C. Usualmente, la temperatura en uso es mayor que aproximadamente 18°C. Para propósitos de diagnóstico, la temperatura usualmente será de aproximadamente temperatura ambiente o más caliente, pero menos que la temperatura de desnaturalización de los componentes en el ensayo. Para propósitos terapéuticos, la temperatura usualmente será la temperatura del cuerpo, típicamente alrededor de 37°C para seres humanos ratones, aunque bajo ciertas situaciones, la temperatura puede aumentarse o disminuirse *in situ* o *in vitro*.

El tamaño y estructura del polipéptido generalmente debe estar en un estado substancialmente estable, y usualmente no en un estado desnaturalizado. El polipéptido puede asociarse con otros polipéptido sin una estructura cuaternaria, por ejemplo, para conferir solubilidad o asociarse con lípidos o detergentes.

El disolvente y los electrolitos usualmente serán un regulador de pH biológicamente compatible, de un tipo utilizado para la conservación de actividades biológicas, y usualmente se aproximará a un disolvente acuoso fisiológico. Usualmente, el disolvente tendrá un pH neutro, típicamente dentro de aproximadamente 5 y 10, y de preferencia alrededor de 7.5. En algunas ocasiones, se agregarán uno o más detergentes, típicamente, uno no desnaturalizante moderado, por ejemplo CHS (hemisuccinato de colesterilo) o CHAPS (sulfonato de 3-[3-colamidopropil]dimetilamino]-1-propano), o una concentración lo suficientemente baja para evitar la interrupción importante de las propiedades estructurales o fisiológicas de la proteína. En otros casos, se puede utilizar detergente duro para efectuar una desnaturalización importante.

### III. Variantes físicas

También se describen en la presente memoria proteínas o péptidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos substancial con la secuencia de aminoácidos del antígeno IL-D80. Las variantes incluyen variantes de especies, polifórmicas o alérgicas.

La homología de secuencia de aminoácido, o identidad de secuencia, se determina optimizando coincidencias de residuos, si es necesario, introduciendo huecos según sea necesario. Ver también Needleham y otros (1979) J. Mol. Biol. 48: 43-453; Sankoff y otros (1983) Capítulo Uno en Time Warps, String Edits, y Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison, Addison-Wesley. Reading, MA; y paquetes de software de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y la Universidad de Wisconsin Genetics Computer Group, Madison WI. La identidad de secuencia cambia cuando se consideran las sustituciones conservadoras como coincidencias. Las sustituciones conservadoras típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. La conservación puede aplicarse a características biológicas, características funcionales o características estructurales. Las secuencias de aminoácidos homólogas típicamente están destinadas a incluir variaciones polimórficas o alélicas e interespecie naturales de una secuencia de proteína. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán una identidad de 25-100% (si pueden introducirse huecos), una identidad de 50-100% (si se incluyen sustituciones conservadoras), con la secuencia de aminoácidos de IL-D80. Las mediciones de identidad serán por lo menos aproximadamente de 65%, en general por lo menos alrededor de 40%, por lo regular por lo menos aproximadamente de 50%, típicamente por lo menos alrededor de 60%, usualmente por lo menos alrededor de 70%, de preferencia por lo menos alrededor de 80%, y muy preferiblemente por lo menos alrededor de 90%.

El ADN de IL-D80 aislado puede modificarse fácilmente a través de sustituciones de nucleótidos, eliminaciones de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de extensiones cortas de nucleótidos. Estas modificaciones dan como resultado nuevas secuencias de ADN que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas que tienen una actividad fisiológica, inmunogénica, antigénica u otra actividad funcional similar. Esta secuencias modificadas pueden usarse para producir antígenos mutantes o para mejorar la expresión. La expresión mejorada puede implicar la amplificación de genes, transcripción aumentada, traducción aumentada y otros mecanismos. "IL-D80 mutante" abarca un polipéptido que de otro modo se incluye en la definición de identidad de secuencia de la IL-D80, como se estableció anteriormente, pero teniendo una secuencia de aminoácidos que difiere de aquella de IL-D80 como normalmente se encuentra por naturaleza, ya sea a través de eliminación, sustitución o inserción. Esto generalmente incluye proteínas que tienen una identidad significativa con una proteína que tienen una secuencia de SEC ID N°: 2, 4, 8 o 10, y que comparten varias actividades biológicas, por ejemplo, antigénicas o inmunogénicas, con aquella secuencias, y pueden contener la mayor parte de las secuencias descritas de longitud completa naturales. Las secuencias de longitud completa típicamente serán preferidas, aunque también serán útiles versiones truncadas, asimismo, son típicamente muy deseados genes o proteínas encontrados en fuentes naturales. Los conceptos similares se aplican a diferentes proteínas de IL-D80, particularmente aquellas que se encuentran en varios animales de sangre caliente, por ejemplo, mamíferos y aves. Estas descripciones generalmente abarcan muchas proteínas de IL-D80, no se limitan a realizaciones de primate particulares específicamente descritas.

La mutagénesis de IL-D80 también puede realizarse haciendo inserciones o eliminaciones de aminoácidos. Se pueden generar sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino- o carboxi-terminales. Se puede realizar la mutagénesis aleatoria en un codón objetivo y los mutantes expresados después pueden clasificarse para la actividad deseada. Los métodos para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tengan una secuencia conocida son bien conocidos en el campo, por ejemplo, a través de mutagénesis con cebador M13 o técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Ver, por ejemplo, Sambrook y otros (1989); Ausubel, y otros (1987 y Suplementos); y Kunkel y

otros (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382. La descripción incluye substituciones preferiblemente conservadoras, por ejemplo de una vez, de dos veces, tres veces, cinco veces, siete veces, etc., a niveles de nucleótido o aminoácido. Preferiblemente, las substituciones estarán lejos de las cisteínas conservadas, y por lo general estarán en las regiones lejos de los dominios estructurales helicoidales. Tales variantes pueden ser útiles para producir anticuerpos específicos y, por lo general compartirán muchas o todas las propiedades biológicas.

La presente invención también proporciona proteínas recombinantes, por ejemplo, proteínas de fusión heterólogas utilizando segmentos de estas proteínas. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas o segmentos de forma natural normalmente no están fusionados de la misma forma. Un concepto similar se aplica a secuencias de ácido nucleico heterólogas.

Además, se pueden hacer nuevas construcciones combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, la unión a objetivo u otros segmentos puede "cambiarse" entre nuevos polipéptidos o fragmentos de fusión diferentes. Cunningham y otros, (1989) *Science* 243: 1330-1336; y O'Dowd y otros (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 151985-15992.

El método de fosforamida descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22: 1859-1862, producirá fragmentos de ADN sintéticos adecuados. Por lo general se obtendrá un fragmento de cadena doble sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas entre sí bajo condiciones apropiadas o agregando la cadena complementaria utilizando polimerasa de ADN con la secuencia cebadora apropiada, por ejemplo, técnicas de PCR.

El análisis estructural puede aplicarse a este gen, en comparación con la familia de citocinas IL-11. La alineación de las secuencias de IL-D80 humana con otros miembros de la familia de IL-11 debería permitir la definición de características estructurales. En particular, se pueden determinar residuos de lámina  $\beta$  y hélice  $\alpha$  utilizando, por ejemplo, el programa RASMOL, ver, Bazan y otros (1996) *Nature* 379: 591; Lodi y otros (1994) *Science*; 263: 1762-1766; Sayle y Milner-White (1995) *TIBS* 20: 374-376; y Gronenberg y otros, (1991) *Protein Engineering* 4:263-269. Los residuos preferidos para substituciones incluyen los residuos expuestos en superficie, los cuales se pronostica que interactúan con el receptor. Otros residuos que deben conservar la función serán substituciones conservadoras, particularmente en la posición lejos de los residuos expuestos en la superficie.

#### IV. Variantes Funcionales

El bloqueo de la respuesta fisiológica a IL-D80 puede resultar de la inhibición competitiva de la unión del ligando a su receptor.

Los ensayos *in vitro* descritos en la presente invención por lo general utilizarán proteína aislada, fragmentos solubles que comprenden segmentos de unión a receptor de estas proteínas, o fragmentos unidos a sustratos de fase sólida. Estos ensayos también permitirán la determinación de diagnóstico de los efectos de mutaciones y modificaciones de segmentos de unión o mutaciones y modificaciones de citocinas, por ejemplo, análogos de IL-D80.

También se describe en la presente memoria el uso de ensayos de clasificación de fármacos competitivos, por ejemplo, cuando anticuerpos de neutralización para la citocina, o fragmentos de unión de receptor compiten con un compuesto de prueba.

Los "derivados" de antígenos de IL-D80 incluyen mutantes de la secuencia de aminoácidos de formas de existencia natural, variantes de glicosilación y conjugados covalentes o agregados con otras porciones químicas. Los derivados covalentes pueden prepararse a través de enlace de funcionalidades a grupos que se encuentran en las cadenas laterales de aminoácidos de IL-D80 o en los terminales N o C, por ejemplo, a través de medios estándares. Ver, por ejemplo, Lundblad y Noyes (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification*, vols. 1-2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL; Hugli (ed. 1989) *Techniques in Protein Chemistry*, Academia Press, San Diego, CA; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press, Boca Raton, FL.

En particular, se incluyen alteraciones de glicosilación, por ejemplo, hechas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en pasos de procesamiento adicionales. Ver, por ejemplo, Elbein (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:497-534. También se abarcan versiones de los péptidos con la misma secuencia de aminoácidos primaria, los cuales tienen otras modificaciones menores, incluyendo residuos aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre IL-D80 y otras proteínas homólogas o heterólogas. Muchos receptores de citocina u otras proteínas de superficie son multiméricos, por ejemplo, entidades homodiméricas, y una construcción de repetición puede tener varias ventajas, incluyendo susceptibilidad disminuida a la escisión proteolítica. Ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido indicador, por ejemplo, luciferasa, con un segmento o dominio de una proteína, por ejemplo, un segmento de unión de receptor, de manera que la presencia o localización del ligando fusionado puede determinarse fácilmente. Ver, por ejemplo, Dull y otros, patente de Estados Unidos N° 4.859.609. Otros patrones de fusión de genes incluyen  $\beta$ -galactosidasa bacteriana, trpE, proteína A,  $\beta$ -lactamasa,  $\alpha$ -amilasa, alcohol deshidrogenasa, factor coincidente alfa de levadura, y etiquetas de detección o purificación tales como una secuencia de FLAG de la secuencia His6. Ver, por ejemplo, Godowski y otros (1988) *Science* 241:812-816.

Los péptidos de fusión típicamente se harán a través de métodos de ácido nucleico recombinante o a través de métodos de polipéptido sintético. Las técnicas para manipulación y expresión de ácido nucleico se describen generalmente en, por ejemplo, Sambrook y otros, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a. edición), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory; y Ausubel y otros, (eds. 1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene y Wiley, NY: Las técnicas para las síntesis de polipéptidos se describen en, por ejemplo, Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232:341-347; Atherton y otros, (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford; y Grant (1992), IRL Press, Oxford; y Grant (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*, W.H. Freeman, NY. Los métodos de replegamiento pueden ser aplicables a proteínas sintéticas.

Esta invención también contempla el uso de derivados de proteínas de IL-D80 distintas a las variaciones en la secuencia de aminoácidos o glicosilación. Tales derivados pueden involucrar asociación covalente o de agregación con porciones químicas o portadores de proteína. Los derivados covalentes o de agregación serán útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos, o en métodos de purificación tales como la purificación de afinidad de compañeros de unión, por ejemplo, otros antígenos. Una IL-D80 puede inmovilizarse uniéndose en forma covalente a un soporte sólido, tal como SEPHAROSE activada con bromuro de cianógeno, a través de métodos que son bien conocidos en la técnica, o adsorbidos sobre superficies de poliolefina, con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído, para utilizarse en el ensayo o purificación de anticuerpos anti-IL-D80 o una composición de unión alternativa. Las proteínas de IL-D80, también pueden marcarse con un grupo detectable, por ejemplo, para utilizarse en ensayos de diagnóstico. La purificación de IL-D80 puede efectuarse a través de un anticuerpo inmovilizado o compañero de unión complementario, por ejemplo, una porción de unión de un receptor.

Una IL-D80 solubilizada o fragmento de esta invención se puede utilizar como un inmunógeno para la producción de antiseros o anticuerpos específicos para la unión. El antígeno purificado puede usarse para clasificar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de antígeno, abarcando fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos naturales, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, etc. También se pueden utilizar antígenos de IL-D80 purificados como un reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados de la citocina, los cuales pueden ser el diagnóstico de una condición fisiológica, o enfermedad anormal o específica. Esta invención contempla anticuerpos que surgen contra secuencias de aminoácidos codificadas por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1, 3, 7 ó 9, o fragmentos de proteínas que las contienen. En particular, esta invención, contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión a, o surgen contra dominios específicos, por ejemplo, las hélices A, B, C, o D.

También se describe en la presente memoria el aislamiento de variantes de especies estrechamente relacionadas adicionales. El análisis de transferencia de Southern y Northern establecerá que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos. Es probable que las IL-D80 estén ampliamente dispersadas en variantes de especies, por ejemplo, roedores, lagomorfos, carnívoros, artiodáctilos, perisodáctilos, y primates.

La invención también proporciona medios para aislar un grupo de antígenos relacionados que presentan tanto puntos distintos como similitudes en estructura, expresión y función. La elucidación de muchos de los efectos fisiológicos de las moléculas se acelerará enormemente a través del aislamiento y caracterización de distintas especies adicionales o variantes polimórficas de las mismas. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en diferentes especies.

Los genes aislados permitirán la transformación de células que carecen de la expresión de una IL-D80, por ejemplo, ya sea tipos o células de especies que carecen de proteínas correspondientes y exhiben una actividad de fondo negativa. Esto debería permitir el análisis de la función de IL-D80 en comparación con células de control no transformadas.

La disección de elementos estructurales críticos que efectúan las varias funciones fisiológicas mediadas a través de estos antígenos es posible utilizando técnicas estándares de biología molecular moderna, particularmente para comparar miembros de la clase relacionada. Ver, por ejemplo, la técnica de mutagénesis de exploración homóloga descrita por Cunningham, y otros (1989) *Science* 243:1339-1336; y aspectos utilizados por O'Dowd, y otros (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechleiter y otros, (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390.

Las funciones intracelulares probablemente podrían involucrar la señalización de receptor. Sin embargo, la internalización de proteína puede ocurrir bajo ciertas circunstancias, y puede ocurrir la interacción entre componentes intracelulares y citocinas. Los segmentos específicos de interacción de IL-D80 con componentes de interacción pueden identificarse a través de mutagénesis o medios bioquímicos directos, por ejemplo, métodos de entrecruzamiento o afinidad. El análisis estructural a través de métodos cristalográficos u otros métodos físicos también será aplicable. La investigación adicional del mecanismo de la transducción de señal incluirá el estudio de componentes asociados que pueden aislarse a través de métodos de afinidad o a través de medios genéticos, por ejemplo, análisis de complementación de los mutantes.

Se seguirá otro estudio de la expresión y control de IL-D80. Los elementos de control asociados con los antígenos deben exhibir una expresión fisiológica, de desarrollo, específica de tejido u otros patrones de expresión diferenciales. Las regiones genéticas cadena arriba o cadena abajo, por ejemplo elementos de control, son de interés.

Los estudios estructurales de los antígenos de IL-D80 conducirán al diseño de nuevos antígenos, particularmente análogos que exhiben propiedades agonistas o antagonistas en la molécula. Esto puede combinarse con métodos de clasificación previamente descritos para aislar antígenos que exhiben espectros deseados de actividades.

## V. Anticuerpos

Se pueden desarrollar anticuerpos contra varios epítomos de las proteínas de IL-D80, incluyendo variantes de especies, polimórficas o alélicas y fragmentos de las mismas, tanto en formas de existencia natural como en sus formas recombinantes. Además, se pueden desarrollar anticuerpos contra IL-D80 en cualquiera de sus formas activas o en sus formas inactivas, incluyendo versiones nativas o desnaturalizadas. También se contemplan anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión y versiones de cadena individual, contra fragmentos predeterminados de los antígenos pueden desarrollarse a través de inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunogénicas. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden clasificarse para unirse a IL-D80 normales o defectuosas, o clasificarse para actividad agonística o antagonística, por ejemplo, mediada a través de un receptor. Los anticuerpos pueden ser agonísticos o antagonísticos, por ejemplo, bloqueando estéricamente la unión a un receptor. Estos anticuerpos monoclonales usualmente se unirán con por lo menos una  $K_D$  de aproximadamente 1 mM, más usualmente por lo menos aproximadamente 300  $\mu$ M, típicamente por lo menos aproximadamente 100  $\mu$ M, muy típicamente por lo menos aproximadamente 30  $\mu$ M, de preferencia por lo menos aproximadamente 10  $\mu$ M, y muy preferiblemente por lo menos aproximadamente 3  $\mu$ M o mejor.

Una proteína de IL-D80 que específicamente se une a o que es específicamente inmunorreactiva con un anticuerpo generado contra un inmunógeno definido, tal como un inmunógeno que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, 4, 8 ó 10, típicamente se determina en un inmunoensayo. El inmunoensayo típicamente utiliza un anticuerpo policlonal, el cual fue desarrollado, por ejemplo, para un polipéptido de SEC ID N°: 2, 4, 8, o 10. Este antisuero se seleccionó teniendo una baja reactividad cruzada contra otra IL-11, por ejemplo, IL-11 humana o de roedor, preferiblemente de la misma especie, y cualquier reactividad cruzada de este tipo se elimina a través de inmunoabsorción antes de utilizarse en el inmunoensayo.

Con el fin de producir antisueros para utilizarse en un inmunoensayo, la proteína de SEC ID N°: 2, 4, 8, o 10, o una combinación de las mismas se aísla como se describe aquí. Por ejemplo, se puede producir una proteína recombinante en una línea de célula de mamífero. Un huésped apropiado, por ejemplo, una cepa endogámica de ratones tales como Balb/c, se inmuniza con la proteína seleccionada, típicamente utilizando un adyuvante estándar, tal como un adyuvante de Freund, y un protocolo de inmunización de ratón estándar (ver, Harlow y Lane, *supra*). Alternativamente, un derivado de péptido sintético de la secuencias descritas aquí, y conjugado a una proteína portadora, puede usarse como un inmunógeno. Los sueros policlonales se recogen y se titulan contra la proteína inmunógena en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo de fase sólida con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Los antisueros policlonales con una titulación de  $10^4$  se seleccionan y se prueban para determinar su reactividad cruzada contra otros miembros de la familia IL-11, por ejemplo, IL-11 de roedor, utilizando un inmunoensayo de unión competitivo tal como aquel descrito por Harlow y Lane, *supra*, en las páginas 570-573. Preferiblemente, por lo menos un miembro de la familia IL-11 distinto se utiliza en esta determinación junto con, por ejemplo, la IL-11 de primate. Los miembros de la familia de IL-11 pueden producirse como proteínas recombinantes y aislarse utilizando biología molecular estándar y técnicas de química de proteína como se describe aquí.

Se pueden utilizar inmunoensayos en el formato de unión competitiva para las determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, la proteína de SEC ID N°: 2 u 8 puede inmovilizarse a un soporte sólido. Las proteínas agregadas al ensayo compiten con la unión de los antisueros para el antígeno inmovilizado. La habilidad de las proteínas anteriores para competir con la unión de los antisueros para la proteína inmovilizada se compara con la proteína de SEC ID N°: 2 o 8. Se calcula el porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores, utilizando cálculos estándares. Aquellos antisueros con menos de 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas listadas anteriormente se seleccionan y combinan. Los anticuerpos que presentan reacción cruzada se eliminan después de los antisueros combinados a través de inmunoabsorción con las proteínas listadas anteriormente.

Después, los antisueros inmunoabsorbidos y combinados se utilizan en un inmunoensayo de unión competitivo como se describió anteriormente para comparar una segunda proteína con la proteína inmunógena (por ejemplo, la proteína similar a IL-11 de SEC ID N°: 2, 4, 8, o 10). Con el fin de hacer esta comparación, las proteínas son cada una analizadas a una amplia escala de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína requerida para inhibir un 50% de la unión del antisuero a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína requerida es menor que el doble de la cantidad de la proteína de la proteína o proteínas seleccionadas que se requieren, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a un anticuerpo generado para el inmunógeno.

Los anticuerpos de esta invención también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden clasificarse por su habilidad para unirse los antígenos sin inhibir la unión a un receptor. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También será útil para detectar o cuantificar la proteína IL-D80 o sus receptores. Ver, por ejemplo Chan (ed. 1987) *Immunology: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, FL; Price y Newman (eds. 1991) *Principles and Practice of Immunoassay*, Stockton Press, N.Y.; y Ngo (ed. 1988) *Nonisotopic Immunoassay*, Plenum Press, N.Y. Las absorciones, eliminaciones cruzadas u otros medios proporcionarán preparaciones de selectividad definida, por ejemplo, caracteres específicos de especie únicos o compartidos. Esta puede ser la base para pruebas que identificarán varios grupos antígenos.

Además, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, de esta invención pueden ser potentes antagonistas que se unen al antígeno e inhiben la unión funcional, por ejemplo, a un receptor que puede producir una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y pueden acoplarse a toxinas o radionúclidos, de manera que cuando el anticuerpo se une al antígeno, se destruye una célula que lo expresa, por ejemplo, en su superficie. Además, estos anticuerpos pueden conjugarse a fármacos u otros agentes terapéuticos, ya sea directa o indirectamente a través de un enlazador, y pueden efectuar el direccionamiento de fármacos.

Los fragmentos de antígeno se pueden unir a otros materiales, en particular polipéptidos, como los polipéptidos fusionados o covalentemente unidos que se usarán como inmunógenos. Un antígeno y sus fragmentos pueden fusionarse o unirse covalentemente a una variedad de inmunógenos, tales como hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero de bovino, toxoide de tétanos, etc. Ver, por ejemplo, Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper y Row, 1969; Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, Nueva York; Williams y otros, (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, vol. 1, Academic Press, Nueva York; y Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, N.Y., para descripciones de métodos para preparar antiseros policlonales.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de varios huéspedes de mamífero, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc.. La descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales puede encontrarse en, por ejemplo, Suites y otros (eds.) Basic and Clinical Immunology (4a. ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas aquí; Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies; y particularmente por Kokler y Milstein (1975) en Nature 256:495-497, la cual discute un método para generar anticuerpos monoclonales.

Otras técnicas adecuadas involucran la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativamente a selección de colecciones de anticuerpos en fagos o vectores similares. Ver, Huse y otros (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Receptore in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281; y Ward y otros, (1989) *Nature* 341: 544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán uniéndose, ya sea covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación se conocen y se describen extensamente tanto en la bibliografía científica, como en la bibliografía de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, substratos, co-factores, inhibidores, porciones fluorescentes, porciones quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. También, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, ver Cabilly, patente de Estados Unidos N° 4,816,567; Moore, patente de Estados Unidos N° 4,642,334; y Queen y otros, (1989) *Proc Nat'l. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033.

Los anticuerpos de esta invención también pueden usarse para cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Se pueden preparar columnas en donde los anticuerpos se unen a un soporte sólido. Ver, por ejemplo, Wilchek y otros (1984) *Meth. Enzymol.* 104: 3-55. La inversa puede usarse para purificar anticuerpos.

Los anticuerpos desarrollados contra cada IL-D80 serán también útiles para generar anticuerpos anti-idiotípicos. Esto será útil para detectar o diagnosticar varias condiciones inmunológicas relacionadas con expresión de los antígenos respectivos.

## 45 VI. Ácidos Nucleicos

Las secuencias peptídicas descritas y los reactivos relacionados son útiles para detectar, aislar o identificar un clon de ADN que codifica IL-D80, por ejemplo, de una fuente natural. Típicamente, será útil aislar un gen de un mamífero, y se aplicarán procedimientos similares para aislar genes de otras especies, por ejemplo, animales de sangre caliente tales como aves y mamíferos. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento de IL-D80 a partir de la misma, por ejemplo, valientes polimórficas, u otras especies. Un número de diferentes aspectos estarán disponibles para aislar exitosamente un clon de ácido nucleico adecuado.

55 La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos a través de métodos estándares, como se describió anteriormente. Se pueden presentar péptidos sintéticos o proteína purificada a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Ver, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press.

60 Por ejemplo, la composición de unión específica puede utilizarse para clasificar una colección de expresión hecha a partir de una línea de célula que expresa una IL-D80. La clasificación de expresión intracelular puede realizarse a través de varios procedimientos de tinción o de inmunofluorescencia. Las composiciones de unión podrían utilizarse para purificar por afinidad o clasificar células que expresan una proteína de fusión de superficie.

65 Los segmentos de péptidos también pueden usarse para pronosticar oligonucleótidos apropiados para clasificar una colección. El código genético puede usarse para seleccionar oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para la clasificación. Ver, por ejemplo, SEC ID N°: 1, 3, 7 ó 9. En combinación con técnicas de reacción en cadena



de polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles para seleccionar clones correctos de una colección. También se utilizarán secuencias complementarias como sondas, cebadores o estructuras de cadena antisentido. Varios fragmentos deberían ser particularmente útiles, por ejemplo, acoplados con un vector anclado o técnicas de PCR complementarias de poli-A o con ADN complementario de otros péptidos.

Esta invención contempla el uso de ADN aislado o fragmentos para codificar un polipéptido IL-D80 correspondiente, antigénico o biológicamente activo; careciendo particularmente de la porción que codifica la porción no traducida 5' de la secuencia descrita. Además, en la presente memoria se describe ADN aislado o recombinante que codifica una proteína biológicamente activa o polipéptido y que es capaz de hibridizar bajo condiciones apropiadas con las secuencias de ADN descritas en la presente. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activo puede ser un antígeno intacto, o fragmento, y tener una secuencia de aminoácidos descrita en por ejemplo, SEC ID N°: 2, 4, 8, o 10, particularmente un polipéptido secretado maduro. Además, también se describe en la presente memoria el uso de ADN aislado o recombinante, o fragmentos del mismo, los cuales codifican proteínas que exhiben una alta identidad con una IL-D80 secretada. El ADN aislado puede tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', por ejemplo, promotores, potenciadores, señales de adición poli-A y otros. Alternativamente, la expresión puede efectuarse uniendo operativamente un segmento de codificación a un promotor heterólogo, por ejemplo, insertando un promotor cadena arriba de un gen endógeno.

Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, ADN, un polímero mixto, el cual está sustancialmente separado de los otros componentes que acompañan por naturaleza a una secuencia nativa, por ejemplo, ribosomas, polimerasas y/o secuencias genómicas de flaqueo de las especies de origen. El término abarca una secuencia de ácido nucleico que se ha retirado de su ambiente de existencia natural, e incluye aislados de ADN recombinantes o clonados y análogos químicamente sintetizados o análogos biológicamente sintetizados por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula. En general, el ácido nucleico estará en un vector o fragmento menor que aproximadamente 50 kb, usualmente menor que aproximadamente 30 kb, típicamente menor que aproximadamente 10 kb, y de preferencia menor que aproximadamente 6 kb.

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

Un ácido nucleico "recombinante" se define ya sea por su método de producción o su estructura. En referencia a su método de producción, por ejemplo, un producto hecho a través un procedimiento, siendo el procedimiento el uso de técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo, involucrando la intervención de seres humanos en la secuencia de nucleótidos, típicamente selección o producción. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico hecho generando una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que no están naturalmente contiguos entre sí, pero excluyen productos de la naturaleza, por ejemplo, mutantes de existencia natural. De esta manera, por ejemplo, se abarcan productos hechos transformando células con cualquier vector no de existencia natural, ya que son ácidos nucleicos que comprenden una secuencia derivada utilizando cualquier proceso de oligonucleótidos sintéticos. Por lo general esto se realiza para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservador, mientras se introduce o elimina típicamente un sitio de reconocimiento de secuencia.

Alternativamente, se realiza la unión de los segmentos de ácido nucleico de funciones deseadas entre sí para generar una entidad genética individual, que comprende la combinación deseada de funciones que no se encuentran en las formas naturales comúnmente disponibles. Los sitios de reconocimiento de enzima de restricción en general son el objetivo de tales manipulaciones artificiales, pero otros objetivos específicos de sitio, por ejemplo, promotores, sitios de replicación de ADN, secuencias de regulación, secuencias de control, u otras características útiles pueden incorporarse por diseño. Un concepto similar está destinado a un polipéptido recombinante, por ejemplo, polipéptido de fusión. Específicamente, se incluyen ácidos nucleicos sintéticos que a través de la redundancia del código genético, codifican polipéptidos similares a fragmentos de estos antígenos y fusiones de secuencias de varias especies diferentes o variantes polimórficas.

Un "fragmento" significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, en general alrededor de por lo menos 22 nucleótidos, ordinariamente por lo menos alrededor de 29 nucleótidos, más frecuentemente por lo menos aproximadamente 35 nucleótidos, típicamente por lo menos aproximadamente 41 nucleótidos, usualmente por lo menos alrededor de 47 nucleótidos, preferiblemente por lo menos alrededor de aproximadamente 55 nucleótidos, y en realizaciones particularmente preferidas será de por lo menos aproximadamente 60, o más nucleótidos, por ejemplo, 67, 73, 81, 89, 95, etc.

Un ADN que codifica para una proteína IL-D80 será particularmente útil para identificar genes, ARNm y especies de ADNc que codifican para proteínas relacionadas o similares, así como ADN y que codifican proteínas homólogas de diferentes especies. Habrá homólogos en otras especies, incluyendo primates, roedores, caninos, felinos, aves y peces. Varias proteínas IL-D80 deberían ser homólogas. Sin embargo, incluso proteínas que tienen una relación de evolución distante al antígeno pueden aislarse fácilmente bajo condiciones apropiadas utilizando estas secuencias si son suficientemente homólogas. Las proteínas de IL-D80 de primates son de interés particular.

Los clones recombinantes derivados de la secuencias genómicas, por ejemplo, conteniendo intrones, serán útiles para estudios transgénicos, incluyendo, por ejemplo, células y organismos transgénicos, y para terapia de genes. Ver, por ejemplo, Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) Encyclopedia of Immunology, Academia Press, San Diego, pp. 1502-1504; Travis (1992) Science 256:1392-1394; Kuhn y otros (1991) Science 254:707-710, 5 Capecchi (1989) Science 244:1288; Robertson (ed. 1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; Rosenberg (1992) J. Clinical Oncology 10:180-199; y Cournoyer y Caskey (1993) Ann. Rev. Immunol. 11:297-329. Alternativamente, la expresión puede efectuarse uniendo operativamente un segmento de codificación a un promotor heterólogo, por ejemplo, insertando un promotor cadena arriba de un gen endógeno. Ver, por ejemplo, Treco y otros, WO 96/29411 o USSN 08/406,030.

La homología substancial, por ejemplo, la identidad, en el contexto de comparación de secuencia de ácido nucleico representa cualquiera de los segmentos, o sus cadenas complementarias, cuando se comparan, son idénticas cuando se alinean óptimamente con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas, en por lo menos un 50% de los nucleótidos, en general por lo menos alrededor de 58%, ordinariamente por lo menos alrededor de 65%, por lo general 15 por lo menos aproximadamente 71%, típicamente por lo menos aproximadamente 77%, usualmente alrededor de 85%, de preferencia por lo menos aproximadamente 95% a 98% o más, tan altos como aproximadamente 99% o más de los nucleótidos. Alternativamente, existe una homología substancial cuando los segmentos hibriden bajo condiciones de hibridación selectivas, con una cadena, o su complemento, típicamente utilizando una secuencia de IL-D80, por ejemplo, SEC ID N°: 1, 3, 7, o 9. Típicamente, la hibridación selectiva ocurrirá cuando exista por lo menos un 55% 20 de identidad sobre una extensión de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos, preferiblemente por lo menos alrededor de 75% sobre una extensión de aproximadamente 25 nucleótidos, y muy preferiblemente alrededor de 90% sobre aproximadamente 20 nucleótidos. Ver, Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213. La longitud de la comparación de identidad, según descrita, puede ser sobre extensiones más largas, y en ciertas realizaciones será sobre una extensión de por lo menos aproximadamente 17 nucleótidos, usualmente por lo menos alrededor de 28 nucleótidos, 25 típicamente por lo menos alrededor de 40 nucleótidos y de preferencia por lo menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos.

Las condiciones severas, con referencia a la homología con respecto a la hibridación, serán condiciones combinadas severas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente aquellos controlados en 30 reacciones de hibridación. Las condiciones severas de temperatura usualmente incluirán temperaturas en un exceso de aproximadamente 30°C, usualmente en un exceso de aproximadamente 37°C, típicamente en un exceso de aproximadamente 55°C, 60°C o 65°C, y preferiblemente en un exceso de aproximadamente 70°C. Las condiciones de sal severas ordinariamente serán menores de aproximadamente 1000 mM, usualmente menor que aproximadamente 400 mM, típicamente menor que aproximadamente 250 mM, de preferencia menor que aproximadamente 150 mM, incluyendo 35 aproximadamente 100, 50 o aún 20 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medición de cualquier parámetro individual. Ver, por ejemplo, Wetmur y Davidson (1968) J. Mol. Biol. 31:349-370. La hibridación bajo condiciones severas debe proporcionar un fondo de por lo menos del doble sobre el fondo, preferiblemente por lo menos 3-5 o más.

Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas subsecuentes, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia(s) de prueba, con relación a la secuencia de referencia, 45 basándose en los parámetros designados.

La alineación óptica de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, a través del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, a través del algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443, a través de la búsqueda de un método de similitud de Pearson 50 y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, a través de aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o a través de inspección visual (ver generalmente Ausubel y otros, *supra*).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación secuencia múltiple a partir de un grupo 55 de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas en pares, para mostrar una relación y un porcentaje de identidad de secuencia. También se representa un árbol o dendrograma mostrando las relaciones agrupadas utilizadas para crear la alineación. El algoritmo PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-360. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151-153. El programa puede alinear hasta 300 secuencias cada una con la longitud máxima de 60 5000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Éste grupo después se alinea con la siguiente secuencia más relacionada o agrupación de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencia se alinean a través de una extensión simple de la alineación en pares de dos secuencias individuales. La alineación final se logra a través de una serie de alineaciones progresivas en pares. El programa se opera designando secuencias específicas y sus 65 coordenadas de aminoácido o nucleótido para regiones de comparación de secuencia y designando los parámetros de programa. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede compararse con otras secuencia de prueba para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia utilizando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10), y huecos de extremos ponderados.

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, el cual se describe por Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El software para realizar análisis de BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo involucra primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de petición, ya sea coincidiendo o mediante la satisfacción de alguna puntuación T de umbral valorado en forma positiva, cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra más cercana (Atschul y otros, *supra*). Esta palabra circundante inicial actúa como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más grandes que las contengan. Los éxitos de palabra después se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que pueda aumentarse la puntuación de alineación acumulativa. La extensión de los éxitos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad de X desde su valor logrado máximo; la puntuación acumulativa va de 0 o más abajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X, determinan la sensibilidad y velocidad de alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (ver, Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, valores esperados (E) de 10, M=5, N=4 y comparación de ambas cadenas.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Una medida de similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que puede ocurrir una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y muy preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico de polipéptidos son substancialmente idénticas, es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. De esta manera, un polipéptido es típicamente substancialmente idéntico a un segundo polipéptido por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son substancialmente idénticas, es que las dos moléculas hibridan entre sí bajo condiciones severas, como se describe más adelante.

La IL-D80 de otras especies de mamíferos puede clonarse y aislarse a través de hibridación de especie cruzada de especies estrechamente relacionadas. La homología puede ser relativamente baja entre especies distantemente relacionadas y de esta manera es aconsejable la hibridación de especies relativamente estrechamente relacionadas. Alternativamente, la preparación de una preparación de un anticuerpo que exhibe un carácter específico de especies menor, puede ser útil en aspectos de clonación de expresión.

#### VII. Fabricación de IL-D80; Miméticos

Se puede obtener el ADN que codifica la IL-D80 o sus fragmentos a través de síntesis química, clasificando colecciones de ADNc, o clasificando colecciones genómicas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas de célula o muestras de tejido. Ver, por ejemplo, Okayama y Berg (1982) Mol. Cel. Biol. 2:161-170; Gubler y Hoffman (1983) Gene 25:263-269; y Glover (ed. 1984) DNA Cloning; A Practical Approach, IRL Press, Oxford. Alternativamente, las secuencias proporcionadas aquí proporcionan cebadores de PCR útiles o permiten la preparación sintética u otro tipo de genes adecuados que codifican una IL-D80; incluyendo realizaciones de existencia natural.

Este ADN puede expresarse en una amplia variedad de células huésped para la síntesis de una IL-D80 de longitud completa o fragmentos que pueden, a su vez, por ejemplo utilizarse para generar anticuerpos policlonales o monoclonales; para estudios unión; para la construcción y expresión de moléculas modificadas; y para estudios de estructura/función. Existe la necesidad de una proteína chaperona para una secreción eficiente, o pueden ser necesarios pasos adicionales para recuperar proteína del compartimento intracelular.

Los vectores, como se utilizan en la presente, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de ADN integrables, y otros vehículos que permiten la integración de fragmentos de ADN en el genoma del huésped. Ver, por ejemplo, Pouwels y otros (1985 y suplementos) Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y.; y Rodríguez y otros, (eds. 1988) Vector: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworth, Boston, MA.

Para los propósitos de esta invención, las secuencias de ADN están unidas operativamente cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o líder de secreción está operativamente unido a un polipéptido si se expresa como una pre-proteína o participa en la dirección del polipéptido hacia la membrana de la célula o en la secreción del polipéptido. Un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está colocado para permitir la traducción. Usualmente, operativamente unido significa contiguo y en marco de lectura, sin embargo, ciertos elementos genéticos tales como genes represores no están unidos en forma

contigua pero siguen estando unidos a las secuencias de operador que su vez controlan la expresión. Ver, por ejemplo, Rodríguez y otros, Capítulo 10, pp. 205-236; Balbas y Bolivar (1990) *Methods in Enzymology* 185:14-37; y Ausubel, y otros (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene y Wiley, NY.

5 Los ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, ver Okayama y otros (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:1136-1142; pMCIneo Poly-A, ver Thomas, y otros (1987) *Cell* 51:503-512; y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610. Ver, por ejemplo, Miller (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42:177-199.

10 Por lo general se deseará expresar un polipéptido IL-D80 en un sistema que proporcione un patrón de glicosilación específico o definido. Ver, por ejemplo, Luckow y Summers (1988) *Bio/Technology* 6:47-55; y Kaufman (1990) *Meth. Enzymol.* 185:487-511.

15 La IL-D80, o un fragmento de la misma, puede diseñarse por ingeniería para unirse por fosfatidil inositol (PI) a una membrana de célula, pero puede eliminarse de las membranas a través del tratamiento con una enzima de escisión de fosfatidil inositol, por ejemplo, fosfatidil inositol fosfolipasa-C. Esto libera el antígeno en forma biológicamente activa y permite la purificación mediante procedimientos estándares de química de proteínas. Ver, por ejemplo, Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse, y otros, (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner y otros (1991) *J. Cell. Biol.* 114:1275-1283.

20 Ahora que la IL-D80 ha sido caracterizada, se pueden preparar fragmentos o derivados de la misma a través de procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Estos incluyen procedimientos tales como aquellos descritos por Stewart y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanzky y Bodanzky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Nueva York; y Villafranca (ed. 1991) *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, San Diego, CA.

#### VIII. Usos

30 La presente invención proporciona reactivos que encontrarán uso en aplicaciones diagnósticas como se describe aquí en cualquier parte, por ejemplo, en condiciones medianas por IL-D80, o más adelante en la descripción de kits de diagnóstico. El gen puede ser útil en ciencias forenses, por ejemplo, para distinguir un roedor de un ser humano, o como marcador para distinguir entre diferentes células que exhiben diferentes patrones de expresión o modificación diferencial.

35 Esta invención también proporciona reactivos con un potencial comercial y/o terapéutico importante. La IL-D80 (de existencia natural o recombinante), sus fragmentos, y anticuerpos para la misma, junto con compuestos identificados como que tienen una afinidad de unión a IL-D80, deberían ser útiles como reactivos para enseñar técnicas de biología molecular, inmunología o fisiología. Se pueden preparar kits apropiados con los reactivos, por ejemplo, en ejercicios de laboratorio de prácticas en la producción o el uso de proteínas, anticuerpos, métodos de clonación, histología, etc.

40 Los reactivos también serán útiles en el tratamiento de condiciones asociadas con una fisiología o desarrollo anormal, incluyendo condiciones inflamatorias. Pueden ser útiles pruebas *in vitro* para determinar la presencia o ausencia de componentes de interacción, los cuales pueden correlacionarse con éxito de estrategias de tratamiento particulares. En particular, la modulación de fisiología de varios, por ejemplo, células hematopoyéticas o linfoides, se logrará a través de métodos apropiados para el tratamiento utilizando las composiciones proporcionadas aquí. Ver, por ejemplo, Thomson (ed. 1998) *The Cytokine Handbook* (3a. ed.) Academia Press, San Diego; Metcalf y Incola (1995) *The Hematopoietic Colony Stimulating Factor* Cambridge University Press; y Aggarwal y Gutterman (1991) *Human Cytokines* Blackwell Pub.

50 Por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con una expresión anormal o señalización anormal a través de una IL-D80, debería ser probablemente un objetivo para un agonista o antagonista. La nueva citocina debería jugar un papel importante en la regulación o desarrollo de células hematopoyéticas, por ejemplo, células linfoides, las cuales afectan a respuestas inmunológicas, por ejemplo, inflamación y/o trastornos autoinmunes. Alternativamente se puede 55 afectar la fisiología o desarrollo vascular, o efectos neuronales.

En particular, la citocinas debería mediar, en varios contextos, la síntesis de citocinas por la células, proliferación, etcétera. Los antagonistas de IL-D80, tales como variantes de muteína de una forma de existencia natural de IL-D80 o anticuerpos de bloqueo, pueden proporcionar una forma selectiva y poderosa para bloquear respuestas inmunes, por 60 ejemplo, en situaciones como respuestas inflamatorias o autoinmunes. Ver también, Samter y otros (eds.) *Immunological Diseases* vol. 1 y 2, Little, Brown and Co.

Se conocen varias condiciones anormales en diferentes tipos de célula, las cuales producirán IL-D80, por ejemplo, según se evalúa a través de la expresión de ARNm mediante análisis de transferencia de Northern, Ver, Berkow (Northern, Ver, Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn y otros, Harrison's *Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, N.Y.M; y Watherall y otros, (eds.) *Oxford Textbook of Medicine*, Oxford University Press, Oxford. Muchas otras condiciones o enfermedades médicas involucran la activación a través de macrófagos o monocitos, y muchas de estas serán sensibles al tratamiento por un agonis-

ta o antagonista proporcionado aquí. Ver, por ejemplo, Sites y Terr (eds.; 1991) Basic and Clinical Immunology, Appleton y Lange, Norwalk, Connecticut; y Samter, y otros (eds.) Immunological Diseases Little, Brown and Co. Estos problemas deberían ser susceptibles a la prevención o tratamiento utilizando composiciones proporcionadas aquí.

La IL-D80, antagonistas, anticuerpos, etcétera, pueden purificarse y después administrarse a un paciente, veterinario o ser humano. Estos reactivos pueden combinarse para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, por ejemplo, en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, convencionales, por ejemplo, adyuvantes inmunogénicos, junto con estabilizadores, excipientes o conservadores fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden esterilizarse por filtración y colocarse en formas de dosificación como por liofilización en frascos de dosificación o almacenarse en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención también contempla el uso de anticuerpos o sus fragmentos de unión, incluyendo formas que no son de unión del complemento.

La clasificación de fármacos utilizando IL-D80 o sus fragmentos, puede realizarse para identificar compuestos que tengan afinidad de unión u otros efectos biológicos importantes sobre las funciones de IL-D80, incluyendo el aislamiento de componentes asociados. Después, se pueden utilizar ensayos biológicos subsecuentes para determinar si los compuestos tienen una actividad estimulante intrínseca y, por lo tanto, es un bloqueante o antagonista ya que bloquea la actividad de la citocina. Asimismo, un compuesto que tiene una actividad estimulante intrínseca puede activar la trayectoria de señal y de esta manera es un agonista en el sentido de que estimula la actividad de IL-D80. También se describe en la presente memoria el uso terapéutico de anticuerpos del bloqueo para IL-D80 como antagonistas y de anticuerpos estimulantes como agonistas. Este aspecto debería ser particularmente útil con otras variantes de especies de IL-D80.

Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores, incluyendo los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. De esta manera, las dosificaciones de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y eficacia. Típicamente, las dosificaciones utilizadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para administración *in situ* de estos reactivos. La prueba en animales de dosis efectivas para el tratamiento de trastornos particulares proporcionará una indicación predictiva adicional de la dosificación para ser humano. Se describen varias consideraciones, por ejemplo, por Gilman y otros, (eds.) Goodman y Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, última edición, Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición, Mack Publishing Co., Easton, Penn. Los métodos para la administración se discuten ahí y más adelante, por ejemplo, para administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica y otros. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina, reguladores de pH y otros compuestos descritos, por ejemplo en, Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey. Las escalas de dosificación generalmente se puede esperar que estén en cantidades más bajas que concentraciones de 1 mM, típicamente en concentraciones menores que aproximadamente 10  $\mu$ M, usualmente menos de aproximadamente 100 mM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 pM (picomolares), y muy preferiblemente menos de aproximadamente 1 fM (fentomolar), con un vehículo apropiado. Por lo general se utilizarán formulaciones de lenta liberación, o una aparato de lenta liberación para la administración continua o a largo plazo. Ver, por ejemplo Langer (1990) Science 249:1527-1533.

La IL-D80, fragmentos de la misma y anticuerpos para la misma o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, pueden administrarse directamente al huésped que se tratará o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugarlos a proteínas portadoras tales como ovalbúmina o albúmina de suero antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas pueden administrarse en muchas formulaciones de dosificación convencionales. Aunque es posible que el ingrediente activo se administre solo, se prefiere presentarlo como una formulación farmacéutica. Las formulaciones típicamente comprenden por lo menos un ingrediente activo, como se definió anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables de los mismos. Cada vehículo debería ser tanto farmacéutica como fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con otros ingredientes y no peligroso para el paciente. Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica o parenteral (incluyendo inyecciones subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar a través de cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Ver, por ejemplo, Gilman y otros (eds. 1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ava. Edición, Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ava. Edición (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn.; Avis, y otros, (eds. 1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, Nueva York; Lieberman y otros, (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, Nueva York; y Lieberman, y otros, (eds. 1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, Nueva York. La terapia descrita en la presente memoria puede combinarse con, o utilizarse junto con otros agentes, por ejemplo, otras citocinas, incluyendo IL-11, o sus antagonistas.

Las formas tanto de existencia natural como recombinantes de las IL-D80 de esta invención son particularmente útiles en kits y métodos de ensayo que son capaces de clasificar compuestos para actividad de unión a las proteínas. Se han desarrollado varios métodos de automatización de ensayos en los últimos años con el fin de permitir la clasificación de cientos de miles de compuestos en un corto período. Ver, por ejemplo, Fodor y otros (1991) Science 251:767-773, la cual describe medios para probar la afinidad de unión de una pluralidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados puede facilitarse enormemente por la disponibilidad de grandes cantidades de IL-D80 purificada, soluble, según se proporciona por esta invención.

Se pueden utilizar otros métodos para determinar los residuos críticos en interacciones de receptor de IL-D80-IL-D80. El análisis mutacional puede realizarse, por ejemplo, ver Somoza, y otros (1993) J. Explot. Med. 178:549-558, para determinar residuos específicos críticos en la interacción y/o señalización. PHD (Rost y Sander (1994) Proteins 19:55-72) y DSC (King y Sternberg (1996) Protein Sci. 5:2298-2310) pueden proporcionar predicciones de estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice (H), cadena  $\beta$  (E) o enrollamiento (L). Las hélices A y D son muy importantes en la interacción de receptor, siendo la hélice D la región más importante. Los límites para las varias hélices se indicaron anteriormente. Dichos residuos expuestos afectarían a la unión de receptor, mientras que los residuos embebidos afectarían a la estructura general.

Por ejemplo, los antagonistas pueden encontrarse normalmente una vez que el antígeno ha sido estructuralmente definido, por ejemplo, a través de datos de estructura terciaria. La prueba de análogos de interacción potenciales ahora es posible después del desarrollo de métodos de ensayo altamente automáticos utilizando una IL-D80 purificada. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas utilizando técnicas de clasificación descritas aquí. De importancia particular son los compuestos que se encuentra que tienen una afinidad de unión combinada para un espectro de moléculas de IL-D80, por ejemplo, compuestos que pueden servir como antagonistas para variantes de especies de IL-D80.

Un método para la clasificación de fármacos utiliza células huésped eucarióticas o procarióticas, las cuales están establemente transformadas con moléculas de ADN recombinante que expresan una IL-D80. Se pueden aislar células que expresan una IL-D80 en aislamiento de otras moléculas. Dichas células, ya sea en forma viable o fija, pueden usarse para ensayos de unión de compañero de unión estándares. Ver, también, Parce y otros (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011, las cuales describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares.

Otra técnica para la clasificación de fármacos involucra un aspecto que proporciona una clasificación de alta producción para compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a una IL-D80 y se describe con detalle por Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En primer lugar, se sintetizan grandes números de diferentes compuestos de prueba de péptidos pequeños sobre un sustrato sólido, por ejemplo, horquillas de plástico o alguna otra superficie apropiada, ver Fodor, y otros (1991). Después, todas las horquillas se hacen reaccionar con IL-D80 solubilizada no purificada o solubilizada purificada y se lavan. El siguiente paso involucra detectar IL-D80 unida.

El diseño de fármacos racional también se puede basar en estudios estructurales de las formas moleculares de IL-D80 y otros efectores o análogos. Los efectores pueden ser otras proteínas que median otras funciones en respuesta a la unión, u otras proteínas que normalmente interactúan con IL-D80, por ejemplo, un receptor. Un medio para determinar qué sitios interactúan con otras proteínas específicas, es una determinación de estructura física, por ejemplo, técnicas de cristalografía de rayos X, o RMN bidimensional. Estas proporcionarán una guía de qué residuos aminoacídicos forman regiones de contacto moleculares, según se modelan, por ejemplo, contra otros modelos de citocina-receptor. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteína, ver, por ejemplo, Blundell y Jonson (1976) Protein Crystallography, Academia Press, Nueva York.

#### IX. Kits

Esta invención también contempla el uso de proteínas IL-D80 sus fragmentos, péptidos y sus productos de fusión en una variedad de kits de diagnóstico y métodos como se definen en las reivindicaciones adjuntas para detectar la presencia de otra IL-D80 o compañero de unión. Típicamente, el kit tendrá un compartimento que contenga un péptido IL-D80 definido o un segmento de gen o un reactivo que reconozca uno o el otro, por ejemplo, los fragmentos o anticuerpos de IL-D80.

Un kit para determinar la afinidad de unión de un compuesto de prueba a una IL-D80 típicamente comprendería un compuesto de prueba; un compuesto marcado, por ejemplo, un compañero de unión o anticuerpo que tenga una afinidad de unión conocida para IL-D80; una fuente de IL-D80 (de existencia natural o recombinante), y medios para separar compuesto marcado unido de libre, tal como una fase sólida para inmovilizar la molécula. Una vez que los compuestos se clasifican, aquellos que tienen afinidad de unión adecuada al antígeno pueden evaluarse en ensayos biológicos adecuados, como es bien conocido en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o antagonistas para la trayectoria de señalización de IL-D80. La disponibilidad de polipéptidos IL-D80 recombinantes también proporciona estándares bien definidos para calibrar tales ensayos.

Un kit preferido para determinar la concentración de, por ejemplo, una IL-D80 en una muestra, típicamente comprendería un compuesto marcado, por ejemplo, un compañero de unión o anticuerpo, que tenga una afinidad de unión conocida por el antígeno, una fuente de citocina (de existencia natural o recombinante) y medios para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo, una fase sólida para inmovilizar la IL-D80. Normalmente se proporcionarán compartimentos que contengan reactivos e instrucciones.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, específicos para IL-D80 o fragmentos son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de IL-D80 y/o sus fragmentos. Dichos ensayos de diagnóstico pueden emplear lisados, células vivas, células fijas, inmunofluorescencia, cultivos de células, fluidos del cuerpo y además pueden involucrar la detección de antígenos relacionados con el antígeno en el suero, o similares. Los ensayos de diagnóstico pueden ser homogéneos (sin un paso de separación entre el reactivo libre y el

complejo de antígeno-compañero de unión) o heterogéneos (con un paso de separación). Existen varios ensayos comerciales, tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo de enzima (EIA), técnica de inmunoensayo de enzima multiplicada (EMIT), inmunoensayo fluorescente de sustrato marcado (SLFIA) y similares. Ver, por ejemplo, Van Vunakis, y otros (1980) *Method Enzymol.* 70:;1-525; Harlow y Lane (1980) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, NY; y Coligan y otros (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Greene y Wiley, N.Y.

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener un uso similar para diagnosticar la presencia de anticuerpos contra una IL-D80 como puede ser el diagnóstico de varios estados anormales. Por ejemplo, la sobreproducción de IL-D80 puede dar como resultado la producción de varias reacciones inmunológicas que pueden ser el diagnóstico de estados fisiológicos anormales, particularmente en condiciones de células proliferativas tales como cáncer, o activación o diferenciación anormal. Además, el patrón de distribución disponible proporciona información de que la citocina se expresa en islotes pancreáticos, sugiriendo la posibilidad de que la citocina puede estar involucrada en la función de ese órgano, por ejemplo, en una condición médica pertinente a diabetes.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se suministran en kits, para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la presente invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, el protocolo, y el marcador, ya esté el anticuerpo o compañero de unión marcado o no marcado, se proporciona IL-D80 marcado. Esto usualmente va junto con otros aditivos, tales como reguladores de pH, estabilizadores, materiales necesarios para la producción de señales tales como sustratos para enzimas y similares. Preferiblemente, el kit también contendrá instrucciones para uso apropiado y desecho de los contenidos después del uso. Típicamente, el kit tiene compartimentos para cada reactivo útil. Deseablemente, los reactivos se proporcionan como un polvo seco liofilizado, donde los reactivos pueden reconstituirse en un medio acuoso proporcionando concentraciones apropiadas de reactivos para realizar el ensayo.

Muchos de los constituyentes antes mencionados de la clasificación de fármacos y los ensayos de diagnóstico pueden utilizarse sin modificación o pueden modificarse en una variedad de formas. Por ejemplo, el marcaje puede lograrse uniendo covalente o no covalentemente una porción que directa o indirectamente proporciona una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, el compañero de unión, el compuesto de prueba, IL-D80, o anticuerpos para la misma pueden marcarse ya sea directa o indirectamente. Las posibilidades para un marcaje directo incluyen grupos marcadores: radiomarcadores tales como  $^{125}\text{I}$ , enzimas (patente de Estados Unidos N° 3,645,090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (patente de Estados Unidos N° 3,940,475) capaces de verificar el cambio en la intensidad de fluorescencia, desplazamiento de longitud de onda o polarización de fluorescencia. Las posibilidades para un marcaje indirecto incluyen biotilación de un constituyente seguido por la unión a avidina acoplada con uno de los grupos marcadores anteriores.

También existen numerosos métodos para separar la IL-D80 unida de la libre o alternativamente el compuesto de prueba unido del libre. La IL-D80 puede inmovilizarse sobre varias matrices seguido por lavado. Las matrices adecuadas incluyen plástico tal como una placa de ELISA, filtros y perlas. Ver, por ejemplo, Coligan, y otros (eds. 1993) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Capítulo 2, Greene y Wiley, N.Y. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el método de partícula magnetizable de anticuerpo de fluoresceína descrito por Rattle, y otros (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación doble de partícula magnética de anticuerpo como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4,659,478.

Se han descrito extensamente en la bibliografía métodos para unir proteínas o sus fragmentos a los diversos marcadores, y no requieren de discusión detallada aquí. Muchas de las técnicas involucran el uso de grupos carboxilo activados ya sea a través del uso de carbodiimida o ésteres activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres mediante la reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloroacetilo, o una olefina activada tal como maleimida, para formación de enlaces, o similares. Las proteínas de fusión también encontrarán uso en estas aplicaciones.

Otro aspecto de diagnóstico de esta invención involucra el uso de secuencias de oligonucleótido o polinucleótido tomadas de la secuencia de una IL-D80. Estas secuencias pueden usarse como sondas para detectar niveles del mensaje de IL-D80 en muestras de pacientes con sospecha de tener una condición anormal, por ejemplo, inflamatoria o autoinmune. Ya que la citocina puede ser un marcador o mediador para la activación, esta puede ser útil para determinar los números de células activadas para determinar, por ejemplo, cuando se puede solicitar una terapia adicional, por ejemplo, de una forma preventiva antes de que los efectos se presenten y progresen a importantes. La preparación de secuencias de nucleótidos tanto de ARN como de ADN, el marcaje de las secuencias y el tamaño preferido de las secuencias ha recibido una amplia descripción y discusión en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Langer-Safer, y otros (1982), *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 79:4381-4385; Caskey (1987) *Science* 236:962-967; y Wilchek y otros (1988) *Anal. Biochem* 171:1-32.

También se contemplan kits de diagnóstico que también prueban la expresión cualitativa o cuantitativa de otras moléculas. La diagnosis o prognosis puede depender de la combinación de múltiples indicaciones utilizadas como marcadores. De esta manera, los kits pueden probar las combinaciones de marcadores. Ver, por ejemplo, Viallet, y otros (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-91. Se pueden utilizar otros kits para evaluar otros subgrupos de células.

## X. Aislamiento de un receptor de IL-D80

Habiendo aislado un ligando de una interacción de ligando-receptor específica, existe un método para aislar el receptor. Ver, por ejemplo, Gearing y otros, (1989) EMBO J. 8:3667-3676. Por ejemplo, se pueden determinar medios para marcar la citocina IL-D80 sin interferir con la unión a su receptor. Por ejemplo, se puede fusionar un marcador de afinidad ya sea al terminal amino o carboxilo del ligando. Dicho marcador puede ser una etiqueta de epítipo FLAG, o por ejemplo, un dominio Ig o Fc. Se puede clasificar una colección de expresión por la unión específica de la citocina, por ejemplo, a través de clasificación de células u otra clasificación para detectar subpoblaciones que expresan dicho componente de unión. Ver, por ejemplo, Ho, y otros (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:11267-11271; y Liu, y otros (1994) J. Immunol. 152:1821-29. Alternativamente, se puede utilizar un método de selección. Ver, por ejemplo, Seed y Aruffo (1987) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 84:3365-3669.

Se pueden aplicar técnicas de entrecruzamiento de proteína con marcador, para aislar compañeros de unión de la citocina IL-D80. Esto podría permitir la identificación de proteínas que específicamente interactúan con la citocina, por ejemplo, en una forma de tipo ligando-receptor. Es una predicción que la IL-D80 se unirá a la subunidad alfa de IL-11R, o una subunidad de receptor estrechamente homóloga. La subunidad beta del receptor probablemente va a ser gp130, posiblemente con la implicación del receptor LIF como un componente de receptor adicional.

Se realizarán experimentos anteriores, según se pronosticó, para determinar si los componentes de receptor de IL-11 conocidos están involucrados en respuestas para IL-D80. También es bastante posible que estos complejos de receptor funcionales puedan compartir muchos o todos los componentes con un complejo de receptor de IL-D80, ya sea una subunidad de receptor específica o una subunidad de receptor accesoria.

## Ejemplos

## I. Métodos Generales

Muchos de los métodos estándares que se presentan a continuación se describen o hacen referencia a, por ejemplo, Maniatis, y otros (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2a. ed.) Vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, y otros Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel y otros (1987 y suplementos), Current Protocols in Molecular Biology Wiley/Greene, NY; Innis, y otros (eds. 1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NY. Los métodos para la purificación de proteína incluyen métodos tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de columna, electroforesis, centrifugación, cristalización, y otros. Ver, por ejemplo, Ausubel y otros (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification", Methods and Enzymology vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; Coligan, y otros (1995 y suplementos) Current Protocols in Protein Science John Wiley and Sons, Nueva York, NY; P. Matsudaira (ed. 1993) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing Academia Press, San Diego, CA; y bibliografía del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo, Pharmacia, Piscataway, NJ, o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos apropiados (etiquetas de epítipo) por ejemplo, a una secuencia de FLAG o un equivalente que puede fusionarse, por ejemplo, a través de una secuencia removible de proteasa. Ver, por ejemplo, Hochuli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, NY; y Crowe y otros (1992) OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

Las técnicas inmunológicas estándares se describen, por ejemplo, en Hertenberg, y otros (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology vols. 1-4, Blackwell Science; Coligan (1991) Current Protocols in Immunology, Wiley/Greene, NY; y Methods in Enzymology vols. 70, 73, 74, 84., 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, y 163. Los ensayos de citocina se describen, por ejemplo, en Thomson (ed. 1998) The Cytokine Handbook (3a. ed.) Academic Press, San Diego; Mire-Sluis y Torpe (1998) (3a. ed.) Academic Press, San Diego; Mire-Sluis y Torpe (1998) Cytokines Academic Press, San Diego; Metcalf y Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors Cambridge University Press, y Aggarwal y Gutterman (1991) Human Cytokines Blackwell Pub.

Los ensayos para actividades biológicas vasculares son bien conocidos en la técnica. Cubrirán actividades angiogénicas y angioestáticas en tumores, u otros tejidos, por ejemplo, proliferación de músculo liso arterial (ver, por ejemplo, Koyoma y otros (1996) Cell 87:1069-1078), adhesión de monocito al epitelio vascular (ver, McEvoy, y otros (1997) J. Exp. Med. 185:2069-2077), etc. También ver Ross (1993) Nature 362:801-809; Reikter y Gordon (1995) Am. J. Pathol. 147:668-677; Thyberg y otros (1990) Atherosclerosis 10:966-990; y Gumbiner (1996) Cell 84:345-357.

Los ensayos para actividades biológicas de célula neural se describen en, por ejemplo, Wouterlood (ed. 1995) Neuroscience Protocols módulos 10, Elsevier; Methods in Neurosciences, Academic Press; y Neuromethods, Humana Press, Totowa, NJ. La metodología de sistemas de desarrollo se describe, por ejemplo, en Meisami (ed.) Handbook of Human Growth and Developmental Biology, CRC Press; y Chrispeels (ed.) Molecular Techniques and Approaches in Developmental Biology, Interscience.



Los análisis de FACS se describen en Melamed, y otros (1990) *Floy Cytometry and Sorting* Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry*, Liss, Nueva York, NY; y Robinson y otros, (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods*, Wiley-Liss, Nueva York, NY.

## 5 II. Clonación de IL-D80 humana

Las secuencias de genes de primate, por ejemplo, ser humano, se proporcionan en la Tabla 1. Estas secuencias se derivan de una base de datos de secuencia. Estas secuencias permiten la preparación de cebadores de PCR, o sondas, para determinar la distribución celular del gen. Estas secuencias permiten el aislamiento de ADN genómico que codifica el mensaje.

Al utilizar la sonda o cebadores de PCR, se sondan varios tejidos o tipos de célula para determinar la distribución celular. Los productos de PCR se clonan utilizando, por ejemplo, un kit de clonación TA (Invitrogen). Los plásmidos de ADNc resultantes se secuencian a partir de ambos extremos en un secuenciador automático (Applied Biosystems).

## III. Expresión celular de IL-D80

Se prepararon una sonda o cebadores apropiados específicos para ADNc que codifica IL-D80 de primate. Típicamente, la sonda está marcada, por ejemplo, por cebado aleatorio.

Análisis de Southern: Se digirió ADN (5 µg) a partir de una colección de ADNc amplificado primaria, con enzimas de restricción apropiadas para liberar los insertos, operando en gel de agarosa al 1% y se transfirieron a una membrana de nylon (Schleicher y Schuell, Keene, NH).

Las muestras para el aislamiento de ARNm humano pueden incluir: células mononucleares de sangre periférica (monocitos, células T, células NK, granulocitos, células B), en reposo (T100); células mononucleares de sangre periférica, activadas con anti-CD3 durante 2, 6, 12 horas de combinación (T101); célula T, clon TH0 Mot 72, en reposo (T102); célula T clon TH0 Mot 72, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 3, 6, 12 horas de combinación (T103); célula T, clon TH0 Mot 72, anérgica tratada con péptido específico durante 2, 7, 12 horas en combinación (T104); célula T, clon TH1, HY06, en reposo (T107); célula T, clon TH1 HY06, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante, 3, 6, 12 horas en combinación (T108); célula T, clon TH1 HY06, anérgico tratado con péptido específico durante 2, 6, 12 horas en combinación (T109); célula T, clon TH2, HY935 en reposo (T110); célula T, TH2, clon HY9035, activado con anti-CD28 y anti-CD3 durante 2, 7, 12 horas en combinación (T111); líneas de tumor de célula T Jurkat y Hut 78, en reposo (T117); clones de célula T, combinados AD130.2, Tc783.12, Tc783.13, Tc783.58, Tc782.69, en reposo (T118); clones de célula T γd aleatorios de célula T en reposo (T119); clon de célula T de CD28; esplenocitos en reposo (B100); esplenocitos, activados con anti-CD40 e IL-4 (B101); líneas de EBV de célula B combinadas con WT49, RSB, JY, CVIR, 721.221, RM3, HSY, en reposo (B102); línea de célula B JY, activada con PMA y ionomicina durante 1, 6 horas en combinación (B103); clones de NK20 combinados, en reposo (K100); clones de NK20 combinados, activados con PMA y ionomicina durante 6 horas (K101); clon NKL derivado de sangre periférica de un paciente con leucemia LGL, IL-2 tratada (K106); línea de precursor hematopoyético TF1, activada con PMA y ionomicina durante 1, 6 horas combinada (C100); línea premonocítica U937, en reposo (M100); línea premonocítica U937, activada con PMA y ionomicina durante 1, 6 horas en combinación (M101); monocitos elutriados, activados con LPS, IFNγ, anti-IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas en combinación (M102); monocitos elutriados, activados con LPS, IFNγ, IL-10 durante 1, 2, 6, 12, 24 horas en combinación (M103); monocitos elutriados, activados con LPS, IFNγ, anti-IL-10 durante 4, 16 horas en combinación (M106); monocitos elutriados, activados con LPS, IFNγ, IL-10 durante 4, 6, 12, 24 horas en combinación (M107); monocitos elutriados, activados con LPS, durante 1, hora (M108); monocitos elutriados, activados con LPS durante 6 horas (M109); DC 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, TNFα 12 días, en reposo (D101); DC 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, TNFα 12 días, activados con PMA y ionomicina durante una hora (D102); DC 70% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, TNFα 12 días, activados con PMA y ionomicina durante una 6 horas (D103); DC 95% CD1a+, de CD34+ GM-CSF, TNFα 12 días clasificados por FACS, activados con PMA y ionomicina durante una 1, 6 horas en combinación (D104); DC 95% CD1a+, ex CD34+ GM-CSF, TNFα 12 días clasificados por FACS, activados con PMA y ionomicina durante una 1, 6 horas en combinación (D105); DC CD1a+, de CD86+ de GM-CSF, TNFα 12 días clasificados por FACS, activados con PMA y ionomicina durante una 1, 6 horas en combinación (D106); DC de monocitos GM-CSF, IL-4, 5 días, en reposo (D107); DC de monocitos GM-CSF, IL-4, 5 días, en reposo (D108); DC de monocitos GM-CSF, IL-4, 5 días, activado con LPS durante 4, 16 horas en combinación (D109); DC de monocitos GM-CSF, IL-4, 5 días, TNFα activado, monocito durante 4, 16 horas en combinación (D110); células epiteliales, no estimuladas; células epiteliales, activadas con IL-1β; línea de sarcoma de fibroblasto de pulmón MRC5, activada con PMA y ionomicina durante 1, 6 horas en combinación (C101); línea de célula de carcinoma epitelial de riñón CHA, activado con PMA y ionomicina durante 1, 6 horas en combinación (C102).

Se identificó un homólogo de roedor, por ejemplo, un ratón, y sus distribuciones se evaluaron de forma similar. Las muestras para aislamiento de ARNm de ratón pueden incluir: línea de célula L fibroblástica de ratón en reposo (C200); células transfectadas con Braf:ER (fusión de Braf al receptor de estrógeno), control (C201); células T naturales de Mel14+ de bazo, en reposo (T209); células T naturales Mel14+ de bazo, estimuladas con IFNγ, IL-12, y anti IL-4 para polarizar a células TH1, expuestas a IFNγ durante 6, 12, 24 horas en combinación (T210); células T naturales de Mel14 de bazo estimuladas con IL-4 y anti-IFNγ para polarizar a células th2, expuestas a IL-4 y IFNγ durante 6, 13, 24 horas, en combinación (T211); células T, polarizadas con TH1 (Mel14 brillante, células CD4+ de bazo polarizadas

durante 7 días con IFN- $\gamma$  y anti IL-4; T200); células T, TH2 polarizadas (Mel14 brillante, células CD4+ de bazo, polarizadas durante 7 días con IL-4 y anti-IFN- $\gamma$ ; T201); células T, altamente polarizadas 3 veces con TH1 a partir de Balb/transgénico (ver, Openshaw, y otros. (1995) J. Exp. Med. 182:1357-1367; activado con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas en combinación T202); células T, altamente polarizadas 3 veces con TH2 de Balb/c transgénico durante 2, 6, 24 horas en combinación (T203); células T, altamente polarizadas 3 veces con TH1 de C57 bl/6 transgénico (activado con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas en combinación; T212); células T, altamente polarizadas 3 veces con TH2 de C57 bl/6 transgénico (activado con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas en combinación; T213); células, altamente polarizadas con TH1 (células T de CD4+ naturales de Balb/c transgénico polarizadas 3 veces con IFN $\gamma$ , IL-12 y anti-IL4; estimuladas con IGIF, IL-12, y anti IL-4 durante 6, 12, 24 horas, en combinación), células pre-T CD44- CD25+, clasificadas de timo (T204); clon de célula T, TH1, D1.1, en reposo durante 3 semanas después de la última estimulación con antígeno (T205); célula T TH1 clon D1.1, 10  $\mu$ g/ml de ConA estimulado durante 15 horas (T206); clon de célula T de TH2, CD35 en reposo durante 3 semanas después de última estimulación con antígeno (T207); clon de célula T TH2, CD35, 10  $\mu$ g/ml de ConA estimulada durante 15 horas (T208); línea de célula B no estimulada CH12 (B201); línea de célula de leucemia de célula B madura no estimulada A20 (B200); células B grandes no estimuladas de bazo (B202); células B de bazo total, activadas con LPS (B203); células dendríticas ricas en metrizamida de bazo, en reposo (D200); células dendríticas de médula ósea, en reposo (D201); células dendrítica derivadas de médula ósea no estimuladas carentes de anti B220, anti CD3 y anti-Clase II, cultivadas en GM-CSF y IL-4 (D202); células dendríticas derivadas de médula ósea, carentes de anti B220, anti CD3, y anti-Clase II, cultivadas en GM-CSF y IL-4, estimuladas con anti-CD40 durante 1, 5 días, en combinación (D203); línea de célula de monocito RAW 264.7 activada con LPS durante 4 horas (M200); macrófagos de médula ósea derivados con GM y CSF (M201); macrófagos de médula ósea derivados con GM-CSF, estimulados con LPS, IFN $\gamma$ , y IL-10 durante 24 horas (M205); macrófagos de médula ósea derivados con GM-CSF, estimulados con LPS, IFN $\gamma$ , y anti IL-10 durante 24 horas (M206); macrófagos peritoneales (M207); línea de célula de macrófago J774, en reposo (M202); línea de célula de macrófago J774 + LPS + anti-IL-10 a 0.5, 1, 3, 6, 12 horas en combinación (M203); línea de célula de macrófago J774 + LPS + IL-10 a 0.5, 1, 3, 5, 12, horas en combinación (M204); líneas de células cebadas no estimuladas MC-9 y MCP-12 (M208); línea de célula endotelial inmortalizada derivada de células endoteliales microvasculares de cerebro, no estimulada (E200); línea de célula endotelial inmortalizada derivada de células endoteliales microvasculares de cerebro, estimulada durante la noche con TNF $\alpha$  (E201); línea de célula endotelial inmortalizada derivada de células endoteliales microvasculares de cerebro, estimulada durante la noche con TNF $\alpha$  (E202); línea de célula endotelial inmortalizada derivada de células endoteliales microvasculares de cerebro, estimulada durante la noche con TNF $\alpha$  y IL-10 (E203); aorta total de ratón wt C57 bl/6; aorta total de ratón ApoE KO de 5 meses (X207); aorta total de ratón ApoE KO de 12 meses (X207); timo wt (O214); timo total rag-1 (O208); riñón total, rag-1 (O209); riñón total, ratón NZ B/W; y corazón total, rag-1 (O202). Se detectó una alta señal en la línea de célula de monocito RAW 264.7 activada con LPS durante 4 horas (M200); células T, altamente polarizadas 3 veces con TH1 de C57 bl/6 transgénico (activado con anti-CD3 durante 2, 6, 24 horas en combinación; T212); y células T, altamente polarizadas con TH1 (células T CD4+ naturales de Balb/C, transgénico, polarizadas 3 veces con IFN $\gamma$ , IL-12 y anti-IL-4; estimuladas con IGIF, IL-12, y anti-IL-4 durante 6, 12, 24 horas, en combinación).

#### IV. Mapeo de cromosoma de IL-D80

Se utilizó un ADNc aislado que codifica la IL-D80. El mapeo de cromosoma es una técnica estándar. Ver, por ejemplo, BIOS Laboratorios (New Haven, CT) y métodos para utilizar un panel híbrido de células somáticas de ratón con PCR.

#### V. Purificación de la proteína IL-D80

Se clasificaron múltiples líneas de células transfectadas para una que exprese la citocina a un nivel alto comparado con otras células. Varias líneas de células se clasificaron y seleccionaron por sus propiedades favorables en el manejo. Se puede aislar IL-D80 natural de fuentes naturales, a través de la expresión de una célula transformada utilizando un vector de expresión apropiado. La purificación de la proteína expresada se logra a través de procedimientos estándares, o se puede combinar con medios diseñados por ingeniería para la purificación efectiva a alta eficiencia a partir de lisados de células o sobrenadantes. Se pueden utilizar segmentos FLAG o His<sub>6</sub> para cada uno de estos aspectos de purificación. Alternativamente, se puede utilizar la cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos, como se ve más adelante.

Se produce proteína en sistemas de expresión de *E. coli*, célula de insecto o de mamífero, según se desee. Se preparó una construcción de IL-D80 con una extensión de etiqueta de epítipo, por ejemplo, FLAG. La construcción se expresó en forma pasajera en células 293 y se purificó a partir de sobrenadante utilizando técnicas de columna de inmunoafinidad de etiqueta. Se obtuvo como resultado una proteína altamente purificada.

#### VI. Aislamiento de genes de IL-D80 homólogos

El ADNc de IL-D80, u otra secuencia homóloga de especie, se pueden utilizar como una sonda de hibridación para clasificar una colección a partir de una fuente deseada, por ejemplo, una colección de ADNc de células de primate. Se pueden clasificar muchas especies diferentes tanto para rigurosidad necesaria para una fácil hibridación, como para la presencia utilizando una sonda. Se utilizarán condiciones de hibridación apropiadas para seleccionar los clones que exhiben carácter específico de hibridación cruzada.

La clasificación a través de hibridación utilizando sondas degeneradas basadas en la secuencia del péptido también permitirán el aislamiento de clones apropiados. Alternativamente, el uso de cebadores apropiados para la clasificación por PCR producirá un enriquecimiento de clones de ácidos nucleicos apropiados.

- 5 Métodos similares son aplicables para aislar variantes de especie, polimórficas o alélicas. Las variantes de especie se aíslan utilizando técnicas de hibridación de especie cruzada basándose en el aislamiento de un aislado o fragmento de longitud completa de una especie como una sonda.

- 10 Alternativamente, los anticuerpos que surgen contra IL-D80 humana se usarán para clasificar células que expresen proteína de reactividad cruzada a partir de una colección apropiada, por ejemplo, de ADNc. La proteína purificada o péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos a través de métodos estándares, como se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o proteínas purificadas se presentan a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Ver, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press. Los anticuerpos resultantes se usan para la clasificación, purificación o diagnóstico, como se describió.

#### VII. Preparación de anticuerpos específicos para IL-D80

- 20 Se presentan péptidos sintéticos o proteína purificada a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Ver, por ejemplo, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press. Se puede preparar suero policlonal o hibridomas. En situaciones apropiadas, el reactivo de unión se marca como se describió anteriormente, por ejemplo, con fluorescencia o de otra manera, o se inmoviliza a un sustrato para métodos de selección. Las técnicas de inmunoselección, de absorciones y técnicas relacionadas están disponibles para preparar reactivos selectivos, por ejemplo, exhibiendo el espectro deseado de selectividad para unión.

#### VIII. Evaluación de amplitud de funciones biológicas

- 30 Se probaron las actividades biológicas de IL-D80, basándose, en parte, en la homología de secuencia y estructural entre IL-D80 y IL-11. Inicialmente, se examinaron ensayos que muestran actividades biológicas de IL-11. Ver, por ejemplo, Jacobsen (1998) en Thomson *The Cytokine Handbook* Academic Press.

##### A. Efectos sobre la proliferación/diferenciación de células progenitoras

- 35 Se evaluó el efecto sobre la proliferación o diferenciación de varios tipos de célula con varias concentraciones de citocina. Se realizó un análisis de respuesta a la dosis, en ciertos casos en combinación con otras citocinas, por ejemplo, aquellas que sinergizan con la citocina relacionada IL-11. Estas incluyen, por ejemplo, IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, LIF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, TPO, ligando de kit o ligando Flt.

- 40 En particular, IL-11 exhibe actividades sinérgicas sobre células madre. La IL-D80 se ensayará en células de sangre de cordón para ver si tiene efecto sobre la proliferación o diferenciación de células progenitoras tempranas derivadas de las mismas. De preferencia, la células son células precursoras tempranas por ejemplo, células madre, que se originan de, por ejemplo, sangre del cordón, médula ósea, timo, bazo, o células progenitoras CD34+. La citocinas se ensayarán para efectos sobre precursores mieloides y/o eritoides incluyendo precursores de célula B.

##### B. Efectos de IL-D80 sobre la proliferación de megacariocitos

- 50 Se aislaron PBMC de capa leuco-plaquetarias de donadores sanos normales a través de centrifugación en ficoll-hypaque como se describió (Boyum, y otros). Las PBMC se cultivaron en 200  $\mu$ l del medio Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) conteniendo uno por ciento de suero AB humano en placas de 96 cavidades (Falcon Becton-Dickinson, NJ) en ausencia o presencia de IL-D80, sola o en combinación con otras citocinas. Las células se cultivaron sólo en medio o en combinación con 100 U/ml de IL-2 (R&D Systems) durante 120 horas. Se agregó 3H-timidina (0.1 mCi) durante las últimas 6 horas de cultivo y la incorporación de 3H-timidina se determinó a través de recuento de escintilación líquida.

55 Las proteínas nativas, recombinantes y de fusión se ensayarán para actividad agonista y antagonista en muchos otros sistemas de ensayos biológicos, por ejemplo en células T, células B, NK, macrófagos, células dendríticas, progenitores hemotopoyéticos, etc.

- 60 La IL-D80 se evaluó para actividad agonista o antagonista en células transfectadas que expresan el receptor de IL-11 y controles.

- 65 La IL-D80 se evaluó para efectos, sola o en combinación con otras citocinas, en activación de macrófago/célula dendrítica y ensayos de presentación de antígeno, producción de citocina de célula T y proliferación en respuesta a antígeno o estímulo alogénico. Ver, por ejemplo, de Waal y otros, (1991) *J. Exp. Med.* 174:1209-1220; de Waal Malefyt y otros, (1991) *J. Exp. Med.* 174:915-924; Fiorentino, y otros (1991) *J. Immunol.* 147: 3815-3822; Fiorentino y otros (1991) *J. Immunol.* 146: 3444-3451; y Groux y otros (1996) *J. Exp. Med.* 184:19-29.

La IL-D80 también se evaluó para efectos sobre la estimulación de células NK. Los ensayos se pueden basar en, por ejemplo, Hsu, y otros, (1992) Internat. Immunol. 4:563-569; y Schwartz, y otros (1994) J. Immunother. 16:95-104. Se aplicaron otros ensayos para evaluar los efectos sobre células T citotóxicas y células LAK. Ver, por ejemplo, Namien Y Mire-Sluis (1998).

Se analizó los efectos de crecimiento y diferenciación de células B, por ejemplo, a través de la metodología descrita en, por ejemplo, Defrance, y otros (1992) J. Exp. Med. 175:671-682; Rousset, y otros (1992) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 889:1890-1893; incluyendo ensayos de factor de cambio IgG2 e IgA2. Observar que, a diferencia de los sobrenadantes COS7, los sobrenadantes de NIH3T3 y COP aparentemente no interfieren con ensayos de células B humanas.

#### C. Efectos sobre la expresión de moléculas de superficie de célula sobre monocitos humanos

Se purificaron monocitos a través de selección negativa a partir de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos normales. En resumen, se incubaron  $3 \times 10^8$  células mononucleares en banda de ficoll sobre hielo con un cóctel de anticuerpos monoclonales (Becton-Dickinson; Mountain View, CA) que consistía en, por ejemplo, 200  $\mu$ l de  $\alpha$ CD2 (Leu-5A), 200  $\mu$ l de  $\alpha$ CD3 (Leu-4), 100  $\mu$ l de  $\alpha$ CD8 (Leu 2a), 100  $\mu$ l de  $\alpha$ CD19 (Leu12), 100  $\mu$ l de  $\alpha$ CD20 (Leu-16), 100  $\mu$ l de  $\alpha$ CD56 (Leu-19), 100  $\mu$ l de  $\alpha$ CD67 (IOM 67; Immunotech, Westbrook, ME) y anticuerpo antiglicoforina (10F7MN, ATCC, Rockville, MD). Las células unidas al anticuerpo se lavaron y después se incubaron con perlas magnéticas acopladas a IgG de antirratón de cabra (Dynal, Oslo, Noruega) a una relación de perla a célula de 20:1. Las células unidas al anticuerpo se separaron de los monocitos a través de la aplicación de un campo magnético. Posteriormente, se cultivaron los monocitos humanos en el medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) conteniendo 1% de suero AB humano en ausencia o presencia de IL-D80, sola o en combinación con otras citocinas.

Se pueden realizar análisis para la expresión de moléculas de superficie de célula a través de inmunofluorescencia directa. Por ejemplo, se incubaron  $2 \times 10^5$  monocitos purificados en solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) conteniendo uno por ciento de suero humano sobre hielo durante 20 minutos. Las células se sedimentaron a 200 x g. Las células se volvieron a suspender en 20 ml de PE o mAb marcado con FITC. Después de una incubación adicional de 20 minutos sobre hielo, las células se lavaron en PBS conteniendo uno por ciento de suero humano seguido por los dos lavados en PBS solo. Las células se fijaron en PBS conteniendo 1% de paraformaldehído y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson; Mountain View, CA). Los mAb ilustrativos utilizados son, por ejemplo: CD11b (anti-mac1), CD11c (anti-gp150/95), CD14 (Leu-M3), CD54 (Leu 54), CD80 (anti-BB1/B7), HLA-DR (L243) de Becton-Dickinson y CD86 (FUN 1; Pharmingen), CD64 (32.2; Medarex), CD40 (mAb89; Schering-Plouge Francia).

#### D. Efectos de IL-D80 sobre la producción de citocina por monocitos humanos

Se aislaron monocitos humanos como se describió y se cultivaron en el medio de Yssel (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) conteniendo 1% de suero AB humano en ausencia o presencia de IL-D80 (dilución de 1/100 de material expresado en baculovirus). Además, los monocitos se estimularon con LPS (*E. Coli* 0127:B8 Difco) en ausencia o presencia de IL-D80 y la concentración de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , GM-CSF, y IL-10) en el sobrenadante del cultivo de células se determinó a través de ELISA.

Para tinción intracitoplásmica para citocinas, se cultivaron monocitos (1 millón/ml) en el medio de Yssel, en ausencia o presencia de IL-D80 y LPS (*E. coli*, 0127:B8 Difco) y 10 mg/ml de Brefeldin A (Epicentro technologies Madison WI) durante 12 horas. Las células se lavaron en PBS y se incubaron en una solución de formaldehído al 2%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron, se volvieron a suspender en regulador de pH de permeabilización (0.5% saponina (Sigma) en PBS/BSA (0.5%)/Azida (1 mM) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células ( $2 \times 10^5$ ) se centrifugaron y se volvieron a suspender en 20 ml de mAb anti-citocina directamente conjugados diluidos a 1:10 en regulador de pH de permeabilización durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los siguientes anticuerpos pueden utilizarse: IL-1 $\alpha$ -PE (364-3B3-14); IL-5-PE (MQ2-13A5); TNF $\alpha$ -PE (MAb11); GM-CSF-PE (BVD2-21C11); y IL-12-PE (C11.5.14; pharmingen san Diego, CA). Posteriormente, las células se lavaron dos veces en el regulador de pH de permeabilización y una vez en PBS/BSA/Azida y se analizaron en un citómetro de flujo FASCan (Becton Dickinson; Mountain View, CA).

Se ensayarán ensayos adicionales en las áreas de remodelación de huesos, condriocitos, neuronas, adipocitos, epitelio gastrointestinal o epitelio bronquial.

#### IX. Generación y análisis de animales genéticamente alterados

Se pueden generar ratones transgénicos a través de métodos estándares. Tales animales son útiles para determinar los efectos de eliminación del gen, en tejidos específicos o completamente en todo el organismo. Esto puede proporcionar nuevas percepciones interesantes en el desarrollo del animal o tejidos particulares en varias etapas. Además, se puede evaluar el efecto sobre varias respuestas a la tensión biológica. Ver, por ejemplo, Hogan, y otros (1995) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, (2a. ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido maduro de:
  - a) la SEC ID N°: 2;
  - b) la SEC ID N°: 4;
  - 10 c) la SEC ID N°: 8; o
  - d) la SEC ID N°: 10.
- 15 2. Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2.
- 20 3. Un polinucleótido aislado o recombinante que codifica un polipéptido que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 8.
4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1.
5. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 4.
- 25 6. Un método para preparar un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 5 en condiciones en las que se exprese el polinucleótido.
7. Un método para detectar un polinucleótido de la reivindicación en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un sonda en condiciones de hibridación severas.
- 30 8. Un kit para detectar un polinucleótido de la reivindicación 1 que comprende un compartimento que contienen una sonda que hibrida en condiciones de hibridación severas de al menos 65°C y menos de aproximadamente 150 mM de sal con al menos 17 nucleótidos contiguos de un polinucleótido de la reivindicación 1 para formar un dúplex.
- 35 9. El kit de la reivindicación 8, en el que dicha sonda es una sonda marcada de forma detectable.
10. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que:
  - 40 1) se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2;
  - 2) se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 4;
  - 3) se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 8;
  - 45 4) se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 10.
- 50 11. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2.
12. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une específicamente al polipéptido maduro de la SEC ID N°: 8.
- 55 13. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es un anticuerpo monoclonal.
14. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es un fragmento Fv.
15. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es un fragmento Fab.
- 60 16. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es un fragmento F(ab)2.
17. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es un anticuerpo policlonal.
- 65 18. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que está marcado de forma detectable.
19. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que es estéril.

## ES 2 330 406 T3

20. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que está en una composición de pH regulado.
21. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10, que estimula la actividad del polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
22. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que inhibe la unión a receptor del polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
23. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 1 mM con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
24. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 100  $\mu$ M con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
25. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 30  $\mu$ M con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
26. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 10  $\mu$ M con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
27. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 3  $\mu$ M con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
28. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 100 nM con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
29. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 30 nM con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
30. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 10 nM con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
31. El anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 que presenta una Kd de al menos 3 nM con el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2 u 8.
32. Un método para usar el anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10, que comprende poner en contacto dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo con una muestra biológica que comprende un antígeno, donde dicho contacto da como resultado la formación de un complejo antígeno:anticuerpo.
33. El método de la reivindicación 32, en el que dicha muestra biológica es de un ser humano.
34. Un kit de detección que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo de la reivindicación 10 y:
- material de instrucciones para el uso de dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo.
  - un compartimento que proporcione la segregación de dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo.
35. Un polipéptido sustancialmente puro o aislado que comprende:
- el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2;
  - el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 4;
  - el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 8; o
  - el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 10.
36. Un polipéptido sustancialmente puro o aislado que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 2.
37. Un polipéptido sustancialmente puro o aislado que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N°: 8.
38. El polipéptido de la reivindicación 35, que es un polipéptido soluble.
39. El polipéptido de la reivindicación 35, que está marcado de forma detectable.

## ES 2 330 406 T3

40. El polipéptido de la reivindicación 35, que está en una composición estéril.

41. El polipéptido de la reivindicación 35, que está en una composición de pH regulado.

5 42. El polipéptido de la reivindicación 35, que se une a un receptor de superficie celular.

43. El polipéptido de la reivindicación 35, que se produce de forma recombinante.

10 44. Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 36 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45. Una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 37 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 46. La composición farmacéutica de la reivindicación 44 que está liofilizada.

47. La composición farmacéutica de la reivindicación 45 que está liofilizada.

20 48. La composición farmacéutica de la reivindicación 44 en la que el vehículo comprende agua.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 45 en la que el vehículo comprende agua.

50. La composición farmacéutica de la reivindicación 44 en la que el vehículo comprende solución salina.

25 51. La composición farmacéutica de la reivindicación 45 en la que el vehículo comprende solución salina.

52. La composición farmacéutica de la reivindicación 44 en la que el vehículo comprende regulador de pH.

30 53. La composición farmacéutica de la reivindicación 45 en la que el vehículo comprende regulador de pH.

54. La composición farmacéutica de la reivindicación 44 que es una formulación oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

35 55. La composición farmacéutica de la reivindicación 54 que es una formulación parenteral.

56. La composición farmacéutica de la reivindicación 45 que es una formulación oral, rectal, nasal, tópica o parenteral.

40 57. La composición farmacéutica de la reivindicación 56 que es una formulación parenteral.

45

50

55

60

65

# ES 2 330 406 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Schering Corporation

5 <120> Citocinas de Mamífero; Reactivos Relacionados

<130> DX01040K1 PCT

<140>

10 <141>

<150> US 09/364.674

15 <151> 30-07-1999

<150> US 09/369.643

<151> 06-08-1999

20 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1

<211> 1213

<212> ADN

30 <213> primate: supuesto *Homo sapiens*

<400> 1

35

40 cactggccca cgctgaagat aggggacttg agttccagtc ttcccttctgc taccgaccgg 60  
ctttgtgacc ttgaacaaga cttcccctcc ctgattccat cctcatgtca catctgaagc 120  
ctccaacttc tgtcactgag ctcaggattc ccaggcaagc ccacggagtg cccacaggg 180  
tcagagccgt aacaggactt ggaaaataac ccgaaaattg ggctcagcct gttgctgctt 240  
cccttgctcc tggttcaagc tgggtgtctgg ggattcccaa ggcccccagg gaggccccag 300  
ctgagcctgc aggagctgcg gagggagtgc acagtcagcc tgcattctgc caggaagctg 360  
ctctccgagg ttccggggcca ggcccaccgc tttgcggaat ctcacctgcc aggagtgaac 420  
ctgtacctcc tgcacctggg agagcagctc cctgatgttt ccctgacctt ccaggcctgg 480  
45 cgccgcctct ctgacctgga gcgtctctgc ttcatctcca ccacgcttca gcccttccat 540  
gccccgctgg gagggctggg gaccagggc cgctggacca acatggagag gatgcagctg 600  
tgggcccatga ggctggacct ccgcgatctg cagcggcacc tccgcttcca ggtgctggct 660  
gcaggattca acctcccga ggaggaggag gaggaagagg aggaggagga ggaggagagg 720  
aaggggctgc tcccaggggc actgggcagc gccttacagg gcccggccca ggtgtcctgg 780  
50 ccccagctcc tctccacctc ccgcctgctg cactccttgg agctcgtctt atctcggggc 840  
gtgcgggagt tgctgctgct gtccaaggct gggcactcag tctggecctt ggggttccca 900  
acattgagcc cccagccctg atcgggtggc tcttagcccc ctgcccccca ccttttagaa 960  
ctttaggact ggagtcttgg catcagggca gccttcgcat catcagcctt ggacaaggga 1020  
gggctcttcc agccccctgc cccaggccct acccagtaac tgaaagcccc tctggctctc 1080  
55 gccagctatt tatttcttgg atatttattt attgtttagg gagatgatgg tttatttatt 1140  
gtcttggggc ccgatggtcc tctcggggc aagccccat gctgggtgcc caataaagca 1200  
ctctcatcca aaa 1213

60

<210> 2

<211> 242

65 <212> PRT

<213> primate: supuesto *Homo sapiens*



# ES 2 330 406 T3

<400> 2

```

5      Gln Asp Leu Glu Asn Asn Pro Lys Ile Gly Leu Ser Leu Leu Leu Leu
      1          5          10          15

10     Pro Leu Leu Leu Val Gln Ala Gly Val Trp Gly Phe Pro Arg Pro Pro
      20          25          30

      Gly Arg Pro Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Phe Thr Val
      35          40          45

15     Ser Leu His Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu Val Arg Gly Gln Ala
      50          55          60

      His Arg Phe Ala Glu Ser His Leu Pro Gly Val Asn Leu Tyr Leu Leu
      65          70          75          80

20     Pro Leu Gly Glu Gln Leu Pro Asp Val Ser Leu Thr Phe Gln Ala Trp
      85          90          95

      Arg Arg Leu Ser Asp Pro Glu Arg Leu Cys Phe Ile Ser Thr Thr Leu
      100         105         110

      Gln Pro Phe His Ala Pro Leu Gly Gly Leu Gly Thr Gln Gly Arg Trp
      115         120         125

30     Thr Asn Met Glu Arg Met Gln Leu Trp Ala Met Arg Leu Asp Leu Arg
      130         135         140

      Asp Leu Gln Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu Ala Ala Gly Phe Asn
      145         150         155         160

35     Leu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Arg
      165         170         175

      Lys Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu Gly Ser Ala Leu Gln Gly Pro Ala
      180         185         190

      Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Leu Leu His Ser
      195         200         205

45     Leu Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Glu Leu Leu Leu Leu Ser
      210         215         220

      Lys Ala Gly His Ser Val Trp Pro Leu Gly Phe Pro Thr Leu Ser Pro
      225         230         235         240

      Gln Pro

```

55

<210> 3

<211> 1098

60 <212> ADN

<213> roedor: supuesto *Mus musculus*

<220>

65 <221> misc feature

## ES 2 330 406 T3

<222> (1)..(1098)

<223> n puede ser a, c, g o t

5 <400> 3

```

10      nccaagntgg tacgcctgca ggtaccggtc cggaaattccc gggtcgaccc acgcgtccgg 60
      ggccagggtga caggagacct tggctggcga ggactggaca ggcaacctgg ccaggagcag 120
      gactaaacag acaaatgaag agtgtagagg gaagaggctg agaaccgagg acagtcagag 180
      gaacggcaca ggggagctgg gctcagcctg ttgctgctac ccttgcttct ggtacaagct 240
      ggttcctggg gggtcccaac agacccctg agccttcaag agctgcgcag ggaattcaca 300
15      gtcagcctgt accttgccag gaagctgctc tctgagggtc agggctatgt ccacagcttt 360
      gctgaatctc gattgccagg agtgaacctg gacctcctgc ccctgggata ccattcttct 420

      aatgtttccc tgactttcca ggcattggcat cacctctctg actctgagag actctgcttc 480
      ctcgctacca cacttcggcc ctcccttgcc atgctgggag ggctggggac ccaggggacc 540
20      tggaccaaca tcaagaggat gcagcaatgg agactctctc tggttcttga tgtggccctg 600
      tgtgtctttc gctcacagggt gctggctgca ggattcaaat gttcaaagga ggaggaggac 660
      aaggaggaag aggaagagga ggaagaagaa gaaaagaagc tgccccagg gcgtctgggt 720
      ggccccaatc aggtgtcatc ccaagtgtcc tggccccagc tgctctatac ctaccagctc 780
      ctctactcca tggagcttgt cctgtctcgg gctgttcggg acctgctgct gctgtccctg 840
25      cccaggcgcc caggctcagc cttggagttc ctaacaccta gcttcaagcc ctgatggagt 900
      gaccttccag ctccctccct cgcccgtaa gactctaagg ctggagtctg gccaatcaca 960
      ggacaggctc tagctcggtt gccttagacc aggcagggtt tcactagctc ccagccctga 1020
      cccaataatt taaaagccct ccagtcctta ccagatattt atttcttga tatttattta 1080
30      tttttaagaa atggttta                                     1098

```

35 <210> 4

<211> 231

<212> PRT

<213> roedor: supuesto *Mus musculus*

40

45

50

55

60

65

# ES 2 330 406 T3

<400> 4

5  
 Gly Leu Ser Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Val Gln Ala Gly Ser  
 1 5 10 15  
 10  
 Trp Gly Phe Pro Thr Asp Pro Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg Arg Glu  
 20 25 30  
 Phe Thr Val Ser Leu Tyr Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu Val Gln  
 35 40 45  
 15  
 Gly Tyr Val His Ser Phe Ala Glu Ser Arg Leu Pro Gly Val Asn Leu  
 50 55 60  
 Asp Leu Leu Pro Leu Gly Tyr His Leu Pro Asn Val Ser Leu Thr Phe  
 65 70 75 80  
 20  
 Gln Ala Trp His His Leu Ser Asp Ser Glu Arg Leu Cys Phe Leu Ala  
 85 90 95  
 25  
 Thr Thr Leu Arg Pro Phe Leu Ala Met Leu Gly Gly Leu Gly Thr Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Trp Thr Asn Ile Lys Arg Met Gln Gln Trp Arg Leu Ser Leu  
 115 120 125  
 30  
 Val Leu Asp Val Ala Leu Cys Val Phe Arg Ser Gln Val Leu Ala Ala  
 130 135 140  
 Gly Phe Lys Cys Ser Lys Glu Glu Glu Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu  
 145 150 155 160  
 35  
 Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Leu Pro Leu Gly Arg Leu Gly Gly Pro  
 165 170 175  
 40  
 Asn Gln Val Ser Ser Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Tyr Thr Tyr  
 180 185 190  
 Gln Leu Leu His Ser Met Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Asp  
 195 200 205  
 45  
 Leu Leu Leu Leu Ser Leu Pro Arg Arg Pro Gly Ser Ala Leu Glu Phe  
 210 215 220  
 50  
 Leu Thr Pro Ser Phe Lys Pro  
 225 230  
 55

<210> 5

<211> 199

<212> PRT

<213> primate: supuesto *Homo sapiens*

65

# ES 2 330 406 T3

<400> 5

5 Met Asn Cys Val Cys Arg Leu Val Leu Val Val Leu Ser Leu Trp Pro  
1 5 10 15

Asp Thr Ala Val Ala Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser  
20 25 30

10 Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser  
35 40 45

15 Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe  
50 55 60

Pro Ala Asp Gly Asp His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met  
65 70 75 80

20 Ser Ala Gly Ala Leu Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg  
85 90 95

Leu Arg Ala Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg  
100 105 110

25 Arg Ala Gly Gly Ser Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr  
115 120 125

30 Leu Gln Ala Arg Leu Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met  
130 135 140

Ser Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro  
145 150 155 160

35 Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala  
165 170 175

Ile Leu Gly Gly Leu His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu  
180 185 190

40 Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu  
195

45

<210> 6

<211> 199

<212> PRT

50

<213> roedor: supuesto *Mus musculus*

<400> 6

55

Met Asn Cys Val Cys Arg Leu Val Leu Val Val Leu Ser Leu Trp Pro  
1 5 10 15

60 Asp Arg Val Val Ala Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser  
20 25 30

65

# ES 2 330 406 T3

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

35

<210> 7

<211> 732

40 <212> ADN

<213> primate: supuesto *Homo sapiens*

<400> 7

45

atggggccaga cggcaggcga ccttggtctg cggttcagcc tgttgctgct tcccttgctc 60  
 50 ctggttcaag ctggtgtctg gggattccca agggcccccag ggaggcccca gctgagcctg 120  
 caggagctgc ggaggaggtt cacagtcagc ctgcatctcg ccaggaagct gctctccgag 180  
 gttcggggcc agggccaccg ctttgcgga tctcacctgc caggagtga cctgtacctc 240  
 ctgcccctgg gagagcagct ccctgatgtt tccctgacct tccaggcctg gcgcgcctc 300  
 tctgaccggg agcgtctctg ctctcatctc accacgcttc agcccttcca tgccccgctg 360  
 55 ggagggtctg ggaccaggg ccgctggacc aacatggaga ggatgcagct gtgggccatg 420  
 aggtggacc tccgcgatct gcagcggcac ctccgcttcc aggtgctggc tgaggattc 480  
 aacctcccgg aggaggagga ggaggaaag gaggaggagg aggaggagag gaaggggctg 540  
 ctcccagggg cactgggcag cgccttacag ggcccggccc aggtgtctg gcccagctc 600  
 ctctccacct accgcctgct gcactcctt gagctcgtct tatctcgggc cgtgcgggag 660  
 60 ttgctgctgc tgtccaaggc tgggcactca gtctggccct tggggttccc aacattgagc 720  
 cccagccct ga 732

65

<210> 8

<211> 243

# ES 2 330 406 T3

<212> PRT

<213> primate: supuesto *Homo sapiens*

5 <400> 8

```

10      Met Gly Gln Thr Ala Gly Asp Leu Gly Trp Arg Leu Ser Leu Leu Leu
        1           5           10           15

      Leu Pro Leu Leu Leu Val Gln Ala Gly Val Trp Gly Phe Pro Arg Pro
        20           25           30

15      Pro Gly Arg Pro Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Phe Thr
        35           40           45

      Val Ser Leu His Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu Val Arg Gly Gln
        50           55           60

20      Ala His Arg Phe Ala Glu Ser His Leu Pro Gly Val Asn Leu Tyr Leu
        65           70           75           80

25      Leu Pro Leu Gly Glu Gln Leu Pro Asp Val Ser Leu Thr Phe Gln Ala
        85           90           95

      Trp Arg Arg Leu Ser Asp Pro Glu Arg Leu Cys Phe Ile Ser Thr Thr
        100          105          110

30      Leu Gln Pro Phe His Ala Pro Leu Gly Gly Leu Gly Thr Gln Gly Arg
        115          120          125

      Trp Thr Asn Met Glu Arg Met Gln Leu Trp Ala Met Arg Leu Asp Leu
        130          135          140

35      Arg Asp Leu Gln Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu Ala Ala Gly Phe
        145          150          155          160

40      Asn Leu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
        165          170          175

      Arg Lys Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu Gly Ser Ala Leu Gln Gly Pro
        180          185          190

45      Ala Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Leu Leu His
        195          200          205

50      Ser Leu Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Glu Leu Leu Leu Leu
        210          215          220

      Ser Lys Ala Gly His Ser Val Trp Pro Leu Gly Phe Pro Thr Leu Ser
        225          230          235          240

55      Pro Gln Pro

```

60 <210> 9

<211> 991

<212> ADN

65 <213> roedor: supuesto *Mus musculus*

# ES 2 330 406 T3

<400> 9

5 atgggcccaga cggcaggcga ccttggctgg cggctcagcc tgttgcctgt acccttgctt 60  
 ctggtacaag ctggttcctg ggggttccca acagacccc tgagcettca agagctgcgc 120  
 agggaattca cagtcagcct gtacctgcc aggaagctgc tctctgaggt tcagggctat 180  
 gtccacagct ttgctgaatc tcgattgcc ggagtgaacc tggacctcct gcccctggga 240  
 10 taccatcttc ccaatgtttc cctgactttc caggcatggc atcacctctc tgactctgag 300  
 agactctgct tcctcgctac cacacttcgg ctcttccctg ccatgctggg agggctgggg 360

15  
 acccagggga cctggaccag ctcaagaggg gagcagctgt gggccatgag gctggatctc 420  
 cgggacctgc acaggcacct ccgctttcag gtgctggctg caggattcaa atgttcaaag 480  
 gaggaggagg acaaggagga agaggaagag gaggaagaag aagaaaagaa gctgccccta 540  
 20 ggggctctgg gtggcccca tccaggtgtca tcccaagtgt cctggcccca gctgctctat 600  
 acctaccagc tccttcactc cctggagctt gtccctgtctc gggctgttcg ggacctgtg 660  
 ctgctgtccc tgcccaggcg cccaggctca gcctgggatt cctaaccact agcttcaagc 720  
 cctatggagt gaccttccag ctccctccct cggccgttaa gactctaagg ctggagtctg 780  
 gccaatcaca ggacaggctc tagctcgttt gccttagacc aggcagggct ttagctagctc 840  
 25 ccagccctga cccaataatt taaaagccct ccagtcctta ccagatattt atttcttga 900  
 tatttattta tttttaagaa atgggtttatt tattgtttca ctcttgagtt aggccaccat 960  
 gctgggtgcc taataaagcc atccagcccg g 991

30

<210> 10

<211> 234

35 <212> PRT

<213> roedor: supuesto *Mus musculus*

40

45

50

55

60

65

# ES 2 330 406 T3

<400> 10

5 Met Gly Gln Thr Ala Gly Asp Leu Gly Trp Arg Leu Ser Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Leu Val Gln Ala Gly Ser Trp Gly Phe Pro Thr Asp  
20 25 30

10 Pro Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg Arg Glu Phe Thr Val Ser Leu Tyr  
35 40 45

15 Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu Val Gln Gly Tyr Val His Ser Phe  
50 55 60

Ala Glu Ser Arg Leu Pro Gly Val Asn Leu Asp Leu Leu Pro Leu Gly  
65 70 75 80

20 Tyr His Leu Pro Asn Val Ser Leu Thr Phe Gln Ala Trp His His Leu  
85 90 95

Ser Asp Ser Glu Arg Leu Cys Phe Leu Ala Thr Thr Leu Arg Pro Phe  
100 105 110

25 Pro Ala Met Leu Gly Gly Leu Gly Thr Gln Gly Thr Trp Thr Ser Ser  
115 120 125

30 Glu Arg Glu Gln Leu Trp Ala Met Arg Leu Asp Leu Arg Asp Leu His  
130 135 140

Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu Ala Ala Gly Phe Lys Cys Ser Lys  
145 150 155 160

35 Glu Glu Glu Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys  
165 170 175

Lys Leu Pro Leu Gly Ala Leu Gly Gly Pro Asn Gln Val Ser Ser Gln  
180 185 190

40 Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Tyr Thr Tyr Gln Leu Leu His Ser Leu  
195 200 205

45 Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Asp Leu Leu Leu Ser Leu  
210 215 220

Pro Arg Arg Pro Gly Ser Ala Trp Asp Ser

225

230