(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 809**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01926604 .8**
(86) Fecha de presentación : **03.04.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1303602**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

(54) Título: **Receptores de citoquina zalfa11 solubles.**

(30) Prioridad: **05.04.2000 US 194731 P**
28.07.2000 US 222121 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

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

(72) Inventor/es: **Sprecher, Cindy, A.;**
Novak, Julia, E.;
West, James, W.;
Presnell, Scott, R.;
Holly, Richard, D. y
Nelson, Andrew, J.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Receptores de citoquina zalfa11 solubles.

Las hormonas y factores de crecimiento de polipéptidos controlan la proliferación y diferenciación de células de organismos multicelulares. Estas moléculas difundibles permiten a las células comunicarse entre sí y actúan de común acuerdo para formar células y órganos, y para reparar tejido dañado. Los ejemplos de hormonas y factores de crecimiento incluyen las hormonas esteroides (por ejemplo, estrógeno, testosterona), hormona paratiroidea, hormona estimulante de folículos, las interleuquinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO) y calcitonina.

Las hormonas y factores de crecimiento influyen en el metabolismo celular uniéndose a receptores. Los receptores pueden ser proteínas de membrana integrales que se enlazan a trayectorias de señalización dentro de la célula, tales como sistemas de segundo mensajero. Otras clases de receptores son moléculas solubles, tales como los factores de transcripción. Son de particular interés receptores de citoquinas, moléculas que promueven la proliferación y/o diferenciación de células. Los ejemplos de citoquinas incluyen eritropoyetina (EPO), que estimula el desarrollo de hematíes; trombopoyetina (TPO), que estimula el desarrollo de células del linaje de megacariocitos; y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que estimula el desarrollo de neutrófilos. Estas citoquinas son útiles para restaurar niveles de hematíes normales en pacientes que padecen anemia, trombocitopenia y neutropenia o que reciben quimioterapia para el cáncer.

Parrish J. *et al*., American J. of Human Genetics, Vol. 65, Nº 4, 19 de Octubre de 1999, página A378 describen la identificación y caracterización del receptor de citoquina zalfa11.

El documento WO 00/17235 describe el receptor de citoquina zalfa11, y composiciones y métodos relacionados.

El documento WO 00/08152 describe ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de receptores de mamíferos huérfanos, denominados OCR-10 y OCR-10A, y sistemas y métodos de ensayo relacionados.

El documento EP 1 088 831 describe proteínas receptoras de hemopoyetina.

Las actividades *in vitro* demostradas de estas citoquinas ilustran el enorme potencial clínico de, y la necesidad de, otras citoquinas, agonistas de citoquinas y antagonistas de citoquinas o compañeros de unión.

La presente invención se dirige a estas necesidades proporcionando un polinucleótido aislado que codifica un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende subunidades de receptor solubles, en el que el complejo receptor comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, y un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

Dentro de un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, y en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por la secuencia de polinucleótido se une a un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagoniza la actividad del ligando. En una realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor homodímero.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor heterodímero o multímero. En una realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un receptor de citoquina de Clase I soluble.

En una realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82). En otra realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido comprende además un motivo WSXWS como se muestra en SEQ ID NO: 13.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor heterodímero o multímero. En una realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble codificado por el polinucleótido forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82). En otra realización, el polinucleótido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble es codificado por el polinucleótido mostrado en SEQ ID NO: 7. En otra realización, el polinucleó-

tido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble comprende además una etiqueta de afinidad.

Dentro de un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados operativamente: (a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y un terminador de transcripción; y (b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción; y en el que el primero y segundo segmentos de ADN están contenidos dentro de un vector de expresión simple.

Dentro de un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende uno o más vectores de expresión.

La presente invención proporciona también uno o más vectores de expresión que comprenden los siguientes elementos: (a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; y (b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; en los que dicho primero y segundo segmentos de ADN están contenidos dentro de un vector de expresión simple o están contenidos dentro de vectores de expresión independientes; y en los que los polipéptidos expresados a partir de dichos segmentos de ADN se asocian para formar un complejo receptor heterodímero o multímero.

En una realización, el vector de expresión descrito antes comprende además una secuencia de señal secretora enlazada operativamente a los primero y segundo segmentos de ADN.

Dentro de un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende uno o más vectores de expresión que comprenden los siguientes elementos: (a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; y (b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; en los que los primero y segundo segmentos de ADN están contenidos dentro de un vector de expresión simple o están contenidos dentro de vectores de expresión independientes; y en los que la célula expresa los polipéptidos codificados por los segmentos de ADN.

En una realización, la célula cultivada que comprende un vector de expresión es como se ha descrito antes, en la que los primero y segundo segmentos de ADN están situados en vectores de expresión independientes y están co-transfectados en la célula, y la célula expresa los polipéptidos codificados por los segmentos de ADN. En otra realización, la célula cultivada que comprende un vector de expresión es como se ha descrito antes, en la que la célula expresa un polipéptido de receptor soluble heterodímero o multímero codificado por los segmentos de ADN. En otra realización, la célula cultivada que comprende un vector de expresión es como se ha descrito antes, en la que la célula segrega un complejo heterodímero o multímero de polipéptido de receptor soluble que se une a un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagoniza con la actividad del ligando.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión que comprende: un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6; y al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor de citoquina Clase I soluble, en los que el primero y el otro segmentos de ADN están conectados enmarcados; y en los que el primero y el otro segmentos de ADN codifican la proteína de fusión. En una realización, la construcción de ADN codifica una proteína de fusión como se ha descrito antes, en la que al menos otro segmento de ADN codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82).

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados operativamente: un promotor de transcripción; una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha descrito antes; y un terminador de transcripción, en el que el promotor está enlazado operativamente a la construcción de ADN, y la construcción de ADN está enlazada operativamente al terminador de transcripción.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada que comprende un vector de expresión como se ha descrito antes, en la que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de ADN.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína de fusión que comprende: cultivar una célula como se ha descrito antes; y aislar el polipéptido producido por la célula.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de receptor soluble aislado que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos como

se muestra en SEQ ID NO: 6, y en el que el polipéptido de receptor soluble se une a un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagoniza con la actividad del ligando. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor homodímero.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un polipéptido de receptor de citoquina Clase I soluble. En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82). En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido comprende además un motivo WSXWS como se muestra en SEQ ID NO: 13.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido de receptor soluble aislado que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero. En una realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende además un polipéptido de receptor de citoquina Clase I soluble. En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble forma un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82). En otra realización, el polipéptido aislado es como se ha descrito antes, en el que el polipéptido de receptor soluble comprende además una etiqueta de afinidad, resto químico, toxina o marca.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un complejo receptor soluble heterodímero o multímero aislado que comprende subunidades de receptor solubles, en las que al menos una de las subunidades de receptor solubles comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6. En una realización, el complejo receptor soluble heterodímero o multímero aislado descrito antes comprende además un polipéptido de receptor de citoquina Clase I soluble. En otra realización, el complejo receptor soluble heterodímero o multímero aislado descrito antes comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4) o un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82).

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido de receptor soluble que forma un complejo heterodímero o multímero que comprende: cultivar una célula como se ha descrito antes; y aislar los polipéptidos de receptor solubles producidos por la célula.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo para un polipéptido de receptor soluble que comprende: inocular en un animal un complejo de polipéptido de receptor soluble seleccionado del grupo constituido por: (a) un polipéptido que comprende un complejo receptor soluble homodímero que comprende SEQ ID NO: 6; (b) un polipéptido que comprende un complejo receptor heterodímero o multímero de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6; (b) un polipéptido que comprende un complejo receptor heterodímero o multímero de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6, y que comprende además un polipéptido de receptor de citoquina Clase I soluble; (c) un polipéptido que comprende un complejo receptor heterodímero o multímero de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6, y que comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); (d) un polipéptido que comprende un complejo receptor heterodímero o multímero de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6, y que comprende además un polipéptido de receptor de IL-13α' soluble (SEQ ID NO: 82): y en el que el complejo de polipéptido obtiene una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo; y aislar el anticuerpo del animal.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por el método descrito antes, que se une específicamente a un complejo receptor homodímero, heterodímero o multímero que comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6. En una realización, el anticuerpo descrito antes es un anticuerpo monoclonal.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para inhibir un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagonizar con la proliferación inducida por la actividad del ligando de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas que comprende cultivar células de médula ósea o sangre periférica con una composición que comprende una cantidad de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6 suficiente para reducir la proliferación de las células hematopoyéticas en las células de médula ósea o sangre periférica en comparación con las células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor soluble. En una realización el método es como se ha descrito antes, en el que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides. En otra realización el método es como se ha descrito antes, en el que las células linfoides son células NK o células T citotóxicas.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un complejo receptor heterodímero o multímero soluble que comprende subunidades de receptor solubles, en el que al menos una de las subunidades comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4), para la fabricación de un medicamento para reducir la proliferación de células B o T neoplásticas en un mamífero con un neoplasma de células B o T.

Dentro de otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un complejo receptor heterodímero o multímero soluble que comprende subunidaes de receptor solubles, en el que al menos una de las subunidades comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4), en un vehículo farmacéutico aceptable, para la fabricación de un medicamento para suprimir una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno.

Éstos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

Antes de comenzar con la invención en detalle, puede ser de ayuda para su comprensión definir los siguientes términos:

La expresión "etiqueta de afinidad" se usa aquí para significar un segmento de polipéptido que puede incorporarse a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar lugares para incorporación del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, puede usarse como etiqueta de afinidad cualquier péptido o proteína para los que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de poli-histidina, proteína A (Nilsson *et al., EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson *et al., Methods Enzymol.* 198:3, 1991), glutationa S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1988), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag® (Hopp *et al., Biotechnology* 6:1204-10, 1988), péptido de unión de estreptavidina u otro epítope antígeno o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al., Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991. Están disponibles de suministradores comerciales ADNs que codifican etiquetas de afinidad (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Las expresiones "amino-terminal" y "carboxilo-terminal" según se usan aquí indican posiciones dentro de polipéptidos. Donde lo permite el contexto, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia particular o porción de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxilo-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está situada próxima al término carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el término carboxilo del polipétido completo.

La expresión "par complemento/anti-complemento" indica restos no idénticos que forman un par estable, asociado no covalentemente, en condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anti-complemento. Otros ejemplos de pares complemento/anti-complemento incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítope), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando es deseable la disociación subsiguiente del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anti-complemento tiene preferiblemente una afinidad de unión $< 10^9$ M^{-1}.

La expresión "complementos de una molécula de polinucleótido" es una molécula de polinucleótido que tiene una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerados" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

La expresión "vector de expresión" se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés enlazado operativamente a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales incluyen secuencias de promotor y terminador, y pueden incluir también uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plásmido o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha separado de su medio genético natural y está así libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas diseñadas genéticamente. Tales moléculas aisladas son las que se separan de su ambiente natural e incluyen cADN y clones genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están libres de otros genes con los que se asocian ordinariamente, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para alguien de experiencia ordinaria en la técnica (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316: 774-78, 1985).

Un polipéptido o proteína "aislado" es un polipéptido o proteína que se encuentra en un estado distinto de su ambiente nativo, tal como aparte de sangre y tejido de animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere proporcionar los polipéptidos en una forma altamente purificada, es decir, mayor del 95% de pureza, más preferiblemente mayor del 99% de pureza. Cuando se usa en este contexto, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptdo en formas físicas alternativas, tales como dímeros o alternativamente formas glicosiladas o derivadas.

La expresión "enlazado operativamente", cuando se hace referencia a segmentos de ADN, indica que los segmentos están dispuestos de manera que funcionan en concierto para sus propósitos pretendidos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y procede a través del segmento de codificación hasta el terminador.

El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es la contrapartida funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre ortólogos son el resultado de especialización.

"Parálogos" son proteínas distintas pero relacionadas estructuralmente fabricadas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen mediante duplicación de genes. Por ejemplo, α-globina, β-globina y mioglobina son parálogos entre sí.

Un "polinucleótido" es un polímero de cadena sencilla o doble de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviadamente "pb"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando lo permite el contexto, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que son de cadena sencilla o de doble cadena. Cuando se aplica el término a moléculas de doble cadena, se usa para indicar longitud total y se entenderá equivalente a la expresión "pares de bases". Se reconocerá por los expertos en la técnica que las dos cadenas de un polinucleótido de doble cadena pueden diferir ligeramente en longitud y que sus extremos pueden ser escalonados como resultado de división enzimática; así, todos los nucleótidos dentro de una molécula de polinucleótido de doble cadena pueden no ser pareados.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces péptidos, producidos natural o sintéticamente. Se hace referencia comúnmente a polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos como "péptidos".

"Sondas y/o cebadores" según se usan aquí pueden ser ARN o ADN. El ADN puede ser cADN o ADN genómico. Las sondas y cebadores de polinucleótidos son ADN o ARN de doble cadena, generalmente oligonucleótidos sintéticos, pero pueden generarse a partir de cADN clonado o secuencias genómicas o sus complementos. Las sondas analíticas serán de al menos 20 nucleótidos de longitud, aunque pueden usarse sondas algo más cortas (14-17 nucleótidos). Los cebadores de PCR son de al menos 5 nucleótidos de longitud, preferiblemente 15 o más nt, más preferiblemente 20-30 nt. Pueden usarse polinucleótidos cortos cuando el objetivo de análisis es una región pequeña del gen. Para un análisis grueso de genes, una sonda de polinucleótido puede comprender un exón completo o más. Pueden marcarse sondas para proporcionar una señal detectable, tal como con una enzima, biotina, un radionúclido, fluoróforo, agente quimioluminiscente, partícula paramagnética y similares, que están disponibles comercialmente de muchas fuentes, tales como Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, y Amersham Corp., Arlington Heights, IL, usando métodos que son muy conocidos en la técnica.

El término "promotor" se usa aquí por su significado reconocido en la técnica para indicar una porción de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la unión de polimerasa de ARN e iniciación de la transcripción. Se encuentran comúnmente, pero no siempre, secuencias de promotor en las regiones no codificantes 5' de genes.

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína puede comprender también componentes no peptídicos, tales como grupos hidratos de carbono. Los hidratos de carbono y otros sustituyentes no peptídicos pueden añadirse a una proteína por la célula en la que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Se definen aquí las proteínas en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos hidrato de carbono no se especifican generalmente, pero pueden estar presentes no obstante.

El término "receptor" se usa aquí para indicar una proteína asociada a célula, o una subunidad polipéptido de tal proteína, que se une a una molécula bioactiva (el "ligando") y media en el efecto del ligando sobre la célula. La unión del ligando al receptor produce un cambio conformacional en el receptor (y, en algunos casos, multimerización del receptor, es decir, asociación de subunidades del receptor idénticas o diferentes) que causa interacciones entre el(los) dominio(s) efector(es) y otra(s) molécula(s) de la célula. Estas interacciones conducen a su vez a alteraciones en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que están ligados a interacciones receptor-ligando incluyen transcripción de genes, fosforilación, desfosforilación, proliferación de células, aumentos en la producción de AMP cíclica, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión de células, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. Los receptores de citoquina de la superficie celular se caracterizan por una estructura multi-dominios como se discute después con más detalle. Estos receptores están anclados en la membrana de la célula por un dominio transmembrana caracterizado por una secuencia de residuos de aminoácidos hidrófobos

(típicamente alrededor de 21-25 residuos), que están flanqueados comúnmente por residuos cargados positivamente (Lys o Arg). En general, los receptores pueden ser unidos a membrana, citosólicos o nucleares; monómeros (por ejemplo, receptor de hormona estimulante de tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multímeros (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). La expresión "polipéptido de receptor" se usa para indicar cadenas de polipéptidos de receptor completas y porciones de ellas, incluyendo dominios funcionales aislados (por ejemplo, dominios de unión de ligando).

Una "secuencia de señal secretora" es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una trayectoria secretora de una célula en la que se sintetiza. El péptido mayor se divide comúnmente para separar el péptido secretor durante el tránsito a través de la trayectoria secretora.

Un "receptor soluble" es un polipéptido de receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son más comúnmente polipéptidos de receptores de unión a ligando que carecen de dominios transmembrana y citoplásmico. Los receptores solubles pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales, tales como etiquetas de afinidad que proporcionan purificación del polipéptido o proporcionan lugares para la incorporación del polipéptido a un sustrato, o secuencias de región constante de inmunoglobulina. Muchos receptores de la superficie celular tienen contrapartidas solubles, de origen natural, que se producen por proteólisis. Se dice que los polipéptidos de receptores solubles están sustancialmente libres de segmentos de polipéptidos transmembrana e intracelular cuando carecen de porciones suficientes de estos segmentos para proporcionar anclado en la membrana o transducción de señal, respectivamente.

La expresión "variante de empalme" se usa aquí para indicar formas alternativas de ARN transcritas desde un gen. La variación de empalme surge naturalmente mediante el uso de lugares de empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita, o menos comúnmente entre moléculas de ARN transcritas separadamente, y puede producir varios mARNs transcritos desde el mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos que tienen secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante de empalme también se usa aquí para indicar una proteína codificada por una variante de empalme de un mARN transcrito desde un gen.

Se entenderá que los pesos moleculares y las longitudes de polímeros determinados por métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como "alrededor" de X o "aproximadamente" X, se entenderá que el valor de X señalado tiene una precisión de ±10%.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva proteína de receptor soluble heterodímero que tiene la estructura de un receptor de citoquina de clase I. El receptor soluble heterodímero incluye al menos una subunidad de receptor soluble zalfa11, descrita en la Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/404.641. Un segundo polipéptido de receptor soluble incluido en el receptor soluble heterodímero pertenece a la subfamilia de receptores que incluye el receptor γ-común de IL-2 (IL-2Rγ, o γc), la subunidad β de receptor de IL-2 y el receptor β-común (es decir, subunidades β de receptor de IL-3, IL-5, IL-13, IL-15 y GM-CSF), subunidades de receptor de IL-13α, IL-13α', IL-15, y similares. Se mostró que el receptor zalfa11 humano y de ratón soluble (IL-21R) monómero y homodímero antagoniza la actividad del ligando natural para el receptor zalfa11, Ligando de zalfa11 (IL-21) (Parris-Novak, J. *et al., Nature* 408: 57-63, 2000). El Ligando de zalfa11 se describe en la Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217. Según la presente invención, se mostró que un receptor zalfa11 soluble heterodímero, del que es ejemplo una realización preferida de un receptor zalfa11 soluble + receptor IL-2Rγ soluble heterodímero (zalfa11/IL-2Rγ), actúa como un antagonista eficaz del Ligando de zalfa11. Como se describe en los presentes ejemplos, el heterodímero zalfa11/IL-2Rγ preferido era un antagonista más eficaz de la actividad de Ligando de zalfa11, y por ello un antagonista más superior que un homodímero o monómero de zalfa11.

Además, también se consideran por la presente invención receptores solubles que comprenden zalfa11 homodímeros y monómeros, así como receptores que comprenden zalfa11 homodímeros, heterodímeros y multímeros que son capaces de señalización intracelular. Tales receptores pueden comprender al menos un dominio extracelular de un receptor zalfa11, y un dominio intracelular de zalfa11 u otro receptor de citoquina clase I. La subunidad heterodímera o multímera adicional puede comprender el dominio extracelular de receptor IL-2Rγ (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), receptor de IL-13α (también conocido como IL-13RA2; SEQ ID NO: 84), IL-13α' (también conocido como IL-13RA1; SEQ ID NO: 82, IL-15 (SEQ ID NO: 86), u otro receptor de clase I, y un dominio intracelular de zalfa11 u otro receptor de citoquina de clase I.

La secuencia de nucleótidos de un ADN que codifica zalfa11 representativo se describe en SEQ ID NO: 1 (de los nucleótidos 1 a 1614), y su secuencia de 538 aminoácidos deducida se describe en SEQ ID NO: 2. En su integridad, el polipéptido de zalfa11 (SEQ ID NO: 2) representa un segmento de polipéptido de longitud completa (residuo 1 (Met) a residuo 538 (Ser) de SEQ ID NO: 2). Los dominios y aspectos estructurales del polipéptido de zalfa11 se describen adicionalmente después.

El análisis del polipéptido de zalfa11 codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 1 reveló un marco de lectura abierto que codificaba 538 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprendía un péptido de señal secretora de 19 residuos de aminoácidos (residuo 1 (Met) a residuo 19 (Gly) de SEQ ID NO: 2) y un polipéptido maduro de 519 aminoácidos (residuo 20 (Cys) a residuo 538 (Ser) de SEQ ID NO: 2). Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13)

correspondiente a los residuos 214 a 218 de SEQ ID NO: 2, el receptor comprende un dominio de unión a citoquina de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos (residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 2); un dominio enlazador (residuos 120 (Pro) a 123 (Pro) de SEQ ID NO: 2); una región de cadena penúltima (residuos 192 (Lys) a 202 (Ala) de SEQ ID NO: 2); un dominio transmembrana (residuos 238 (Leu) a 255 (Leu) de SEQ ID NO: 2); un dominio de señalización intracelular completo (residuos 256 (Lys) a 538 (Ser) de SEQ ID NO: 2) que contiene un lugar de señalización "Caja I" (residuos 267 (Ile) a 273 (Pro) de SEQ ID NO: 2) y un lugar de señalización "Caja II" (residuos 301 (Leu) a 304 (Gly) de SEQ ID NO: 2). Además hay un lugar de unión de STAT3 (YXXQ) situado cerca del término C de los residuos 519 (Tyr) a 522 (Gln) de SEQ ID NO: 2. Los expertos en la técnica reconocerán que estos límites de dominios son aproximados, y se basan en alineamientos con proteínas conocidas y predicciones de pliegue de proteínas. Además de estos dominios, los aspectos del receptor conservados en el receptor codificado incluyen (como se muestra en SEQ ID NO: 2) un residuo de Trp conservado en posición 138 y un residuo de Arg conservado en posición 201. Además, el zalfa11 contiene residuos de Cys conservados típicos de receptores de citoquina clase I, mostrados en los residuos 25, 35, 65 y 81 de SEQ ID NO: 2, y las regiones correspondientes de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 69 descritas después. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, residuos y secuencias de polipéptido de zalfa11 descritos antes son como se muestra en SEQ ID NO: 1. El polipéptido de receptor soluble zalfa11 humano que comprende los residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 2 se muestra en SEQ ID NO: 6, y la secuencia de polinucleótidos correspondiente para el polipéptido de receptor soluble zalfa11 humano se muestra en SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de polinucleótidos que comprende un fragmento del receptor IL-2Rγ humano que codifica un polipéptido soluble del receptor IL-2Rγ soluble de 232 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). Los expertos en la técnica reconocerán que estos límites de dominios para el dominio extracelular del receptor IL-2Rγ son aproximados, y que están abarcados dentro del alcance de la presente invención otros polipéptidos del receptor IL-2Rγ soluble, tales como los que incluyen una secuencia de señal secretora de polipéptido del receptor IL-2Rγ o aminoácidos de polipéptido del receptor IL-2Rγ adicionales en el dominio extracelular.

Se identificó una forma variante del polipéptido de zalfa11 humano (publicación WIPO Nº WO 00/27822, mostrada como SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO: 4 aquí) y se muestra en la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 64; y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 65). Este polipéptido de receptor zalfa11 alternativo particular contiene 568 aminoácidos, y comprende un péptido de señal secretora predicha de 20 residuos de aminoácidos (residuo 1 (Met) a residuo 20 (Gly) de SEQ ID NO: 65), y un polipéptido maduro de 548 aminoácidos (residuo 21 (Met) a residuo 568 (Ser) de SEQ ID NO: 65). Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) correspondiente a los residuos 244 a 248 de SEQ ID NO: 65, el receptor comprende un dominio de unión a citoquina de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos (residuos 21 (Met) a 267 (His) de SEQ NO: 65); sin enlazador de dominio; una región de cadena penúltima (residuos 222 (Lys) a 232 (Ala) de SEQ ID NO: 65); un dominio transmembrana (residuos 268 (Leu) a 285 (Leu) de SEQ ID NO: 65); un dominio de señalización intracelular completo (residuos 268 (Lys) a 568 (Ser) de SEQ ID NO: 65) que contiene un lugar de señalización "Caja I" (residuos 297 (Ile) a 303 (Pro) de SEQ ID NO: 65) y un lugar de señalización "Cja II" (residuos 331 (Leu) a 334 (Gly) de SEQ ID NO: 65). Además, hay un lugar de unión de STAT3 (YXXQ) situado cerca del término C de los residuos 549 (Tyr) a 552 (Gln) de SEQ ID NO: 65. Los expertos en la técnica reconocerán que estos límites de dominios son aproximados, y se basan en alineamientos con proteínas conocidas y predicciones de pliegue de proteínas. Además de estos dominios, los aspectos del receptor conservados en el receptor codificado incluyen (como se muestra en SEQ ID NO: 65) un residuo de Trp conservado en posición 168, y un residuo de Arg conservado en posición 231. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, residuos y secuencias de polipéptido de zalfa11 descritos antes son como se muestra en SEQ ID NO: 64. Este polipéptido variante de receptor soluble zalfa11 humano particular, que comprende los residuos 21 (Met) a 267 (His) de SEQ ID NO: 65 (SEQ ID NO: 69) y la secuencia de polinucleótidos correspondiente para este polipéptido de receptor soluble zalfa11 humano particular se muestran en SEQ ID NO: 68. Esta forma variante del receptor zalfa11 humano está incluida en los complejos receptores zalfa11 heterodímero y multímero de la presente invención, descritos aquí.

Además, otras formas variantes de receptor zalfa11 se consideran por la presente invención, en las que el dominio extracelular de la forma variante descrita antes (por ejemplo, 21 (Met) a 267 (His) de SEQ ID NO: 65, o SEQ ID NO: 69) comprende un enlazador de dominio que comprende los aminoácidos PAPP (SEQ ID NO: 70) insertados entre los aminoácidos 161 (Ser) y 162 (Arg) de SEQ ID NO: 65, o la región correspondiente de SEQ ID NO: 69. Un enlazador de dominio preferido comprende una secuencia de aminoácidos de preferiblemente 4 a 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente 14 aminoácidos de longitud, en la que al lado de la secuencia de motivo PAPP (SEQ ID NO: 70) puede estar presente cualquier aminoácido. Por ejemplo, un receptor soluble zalfa11 variante que contiene enlazador representativo se muestra en SEQ ID NO: 71. Además, otras secuencias de zalfa11 variantes pueden incluir, en referencia a SEQ ID NO: 65, un Gly en posición 162 en lugar de un Arg, o el mismo ARG para sustitución de Gly en la región correspondiente de SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 71, u otra variante de SEQ ID NO: 65 o SEQ ID NO: 69 que contiene un enlazador de dominio como se ha descrito antes. Las secuencias de ADN correspondientes que codifican tales variantes pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica usando la información presente en la Tabla 1 y la Tabla 2.

El Ligando de zalfa11 es una citoquina de cuatro haces helicoidales segregada de forma de "hélice corta". La secuencia de polinucleótidos del Ligando de zalfa11 se muestra en SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 10. La secuencia de señal secretora comprende los residuos de aminoácidos 1 (Met) a 31 (Gly), y el polipéptido maduro comprende los residuos de aminoácidos 32 (Gln) a 162 (Ser) (como

se muestra en SEQ ID NO: 10). En general, se predice que las citoquinas tengan una estructura de cuatro hélices alfa, siendo las hélices A, C y D más importantes en interacciones ligando-receptor, y son más altamente conservadas entre miembros de la familia. Con referencia a la secuencia de aminoácidos del Ligando de zalfa11 humano mostrada en SEQ ID NO: 10, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Ligando de zalfa11 humano, IL-15 humana, IL-4 humana y GM-CSF humano, se predice que la hélice A de Ligando de zalfa11 es definida por los residuos de aminoácidos 41-56; la hélice B por los residuos de aminoácidos 69-84; la hélice C por los residuos de aminoácidos 92-105; y la hélice D por los residuos de aminoácidos 135-148; como se muestra en SEQ ID NO: 10. El análisis estructural sugiere que el lazo A/B es largo, el lazo B/C es corto y el lazo C/D es largo paralelo. Los residuos de cisteína conservados dentro del Ligando de zalfa11 corresponden a los residuos de aminoácidos 71, 78, 122 y 125 de SEQ ID NO: 10. Una colocación de cisteína consecuente es una confirmación adicional de la estructura de cuatro haces helicoidales. También está altamente conservada en la familia que comprende IL-15, IL-2, IL-4, GM-CSF y Ligando de zalfa11 la secuencia Glu-Phe-Leu como se muestra en SEQ ID NO: 10 en los residuos 136-138.

Un análisis adicional de Ligando de zalfa11 en base a alineamientos múltiples de citoquinas conocidas predice que los residuos de aminoácidos 44, 47 y 135 (como se muestra en SEQ ID NO: 10) juegan un papel importante en la unión de Ligando de zalfa11 a su receptor cognado. En base a una comparación entre secuencias de Ligando de zalfa11 humano y de ratón, se encontraron residuos bien conservados en las regiones que se predice codifican hélices alfa A y D. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, residuos y secuencias de polipéptido de Ligando de zalfa11 descritos aquí son como se muestra en SEQ ID NO: 9. El Ligando de zalfa11 de ratón se muestra en SEQ ID NO: 46, y la secuencia del polipéptido correspondiente en SEQ ID NO: 47.

La actividad de las moléculas de la presente invención puede medirse usando una variedad de ensayos que miden la proliferación y/o la unión a células que expresan el receptor zalfa11. Son de particular interés cambios en células dependientes de Ligando de zalfa11. Se diseñó un linaje celular adecuado para ser dependiente de Ligando de zalfa11 que comprende un linaje celular BaF3 dependiente de IL-3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al., Mol. Cell. Biol*. 6: 4133-4135, 1986). Además, otros linajes celulares adecuados a diseñar para ser dependientes de Ligando de zalfa11 incluyen FDC-P1 (Hapel *et al., Blood* 64: 786-790, 1984); y MO7e (Kiss *et al., Leukemia* 7: 235-240, 1993). Pueden establecerse linajes celulares dependientes de factor de crecimiento según métodos publicados (por ejemplo, Greenberger *et al., Leukemia Res*. 8: 363-375, 1984; Dexter *et al*., en Baum *et al. Reds., Experimental Hematology Today*, 8th Ann. Mtg. Int. Soc. Exp. Hematol. 1979, 145-156, 1980).

El Ligando de zalfa11 estimula la proliferación, activación, diferenciación y/o inducción o inhibición de la función celular especializada de células implicadas en homeostasis de hematopoyesis y función inmune. En particular, los polipéptidos de Ligando de zalfa11 estimulan proliferación, activación, diferenciación, inducción o inhibición de funciones celulares especializadas de células de los linajes hematopoyéticos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, células T, células B, células NK, células dendríticas, monocitos y macrófagos; así como células epiteliales. La proliferación y/o diferenciación de células hematopoyéticas puede medirse *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* administrando Ligando de zalfa11 al modelo de animal apropiado. Los ensayos que miden proliferación o diferenciación celular son muy conocidos en la técnica y se describen aquí. Por ejemplo, los ensayos que miden proliferación incluyen ensayos tales como quimiosensibilidad a colorante rojo neutro (Cavanaugh *et al., Investigational New Drugs* 8: 347-354, 1990), incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook *et al., Analytical Biochem*. 179: 1-7, 1989), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferantes (Porstmann *et al., J. Immunol. Methods* 82: 169-179, 1985, y el uso de sales de tetrazolio (Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983; Alley *et al., Cancer Res*. 48: 589-601, 1988; Marshall *et al., Growth Reg*. 5: 69-84, 1995; y Scudiero *et al., Cancer Res*. 48: 4827-4833, 1988. Los ensayos que miden diferenciación incluyen, por ejemplo, medición de marcadores de la superficie celular asociados con la expresión específica de la fase de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, *FASEB*, 5: 281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57: 63-75, 1994; Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 161-171, 1989). A la inversa, estos ensayos pueden usarse en una competición para valorar la actividad antagonista o de unión de Ligando de zalfa11 del receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tales como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles de la presente invención. Además, el receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tales como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles de la presente invención pueden usarse como antagonista o agente de unión de Ligando para modular el sistema inmune y las actividades hematopoyéticas del Ligando de zalfa11.

Se aisló Ligando de zalfa11 de tejido conocido por tener una función inmunológica importante y que contiene células que juegan un papel en el sistema inmune. El Ligando de zalfa1 se expresa en células de sangre periférica seleccionadas, activadas CD3+, y se ha mostrado que la expresión de Ligando de zalfa11 aumenta después de la activación de células T. Además, los resultados de experimentos descritos en la Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217, y la presente sección de Ejemplos, demuestran que el Ligando de zalfa11 tiene un efecto en el crecimiento/expansión y/o estado diferenciado de células NK o progenitores de NK. Una evidencia adicional demuestra que el Ligando de zalfa11 afecta a la proliferación y/o diferenciación de células T y células B *in vivo*. Se conocen en general factores que estimulan la proliferación de progenitores hematopoyéticos y activan células maduras. Las células NK son sensibles a IL-2 sola, pero la proliferación y activación requiere generalmente factores de crecimiento adicionales. Por ejemplo, se ha mostrado que se requerían IL-7 y Factor Eslabón (ligando de c-equipo) para formación de colonias de progenitores de NK. Era más eficaz IL-15 + IL-2 en combinación con IL-7 y Factor Eslabón (Mrózek *et al., Blood* 87: 2632-2640, 1996). Además, pueden ser necesarias citoquinas no identificadas para proliferación de subgrupos específicos de células NK y/o progenitores de NK (Robertson *et al., Blood* 76: 2451-2438, 1990). Una composición que comprende Ligando de zalfa11 e IL-15 estimula progenitores de NK y células NK, con la

evidencia de que esta composición es más eficaz que los factores y combinaciones de factores descritos previamente. Tales composiciones pueden comprender además ligando de equipo o factor de células estaminales. Así, el receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tales como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles de la presente invención pueden usarse como antagonista o agente de unión de Ligando para disminuir la actividad del Ligando de zalfa11 en células NK.

Además, la distribución en tejido de un receptor para una citoquina dada ofrece una fuerte indicación de los lugares potenciales de acción de esa citoquina. El análisis de Northern de receptor zalfa11 reveló transcriptos en bazo, timo, nodo linfoide, médula ósea y leucocitos de sangre periférica humanos. Se identificaron tipos de células específicos como que expresan receptores zalfa11, y se vieron señales fuertes en una reacción de linfocitos mezclados (MLR) y en el linfoma Raji de Burkitt. Los dos linajes celulares monocíticos, THP-1 (Tsuchiya *et al., Int. J. Cancer* 26: 171-176, 1980) y U937 (Sundstrom *et al., Int. J. Cancer* 17: 565-577, 1976), eran negativos. El receptor zalfa11 se expresa en niveles relativamente altos en la MLR, en la que se mezclan células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) de dos individuos, produciendo activación mutua. La detección de altos niveles de transcripto en la MLR pero no en poblaciones de células T o B en reposo sugiere que la expresión de receptor zalfa11 puede inducirse en uno o más tipos de células durante la activación. La activación de poblaciones aisladas de células T y B puede conseguirse artificialmente estimulando células con PMA e Ionomicina. Cuando se sometieron células clasificadas a estas condiciones de activación, los niveles de transcripto de receptor zalfa11 aumentaron en ambos tipos de células, apoyando un papel para este receptor y Ligando de zalfa11 en respuestas inmunes, especialmente en expansiones de células T y B autocrina y paracrina durante la activación. El Ligando de zalfa11 puede jugar también un papel en la expansión de progenitores más primitivos implicados en linfopoyesis. Así, el receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tales como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles de la presente invención pueden usarse como antagonista o agente de unión de Ligando para modular las actividades linfopoyéticas del Ligando de zalfa11.

Se encontró que el receptor zalfa11 está presente en bajos niveles en células T y B en reposo, y sobrerregulado durante la activación en ambos tipos de células. De modo interesante, las células B también infrarregulan el mensaje más rápidamente que las células T, sugiriendo que la amplitud de la señal y el tiempo de apagado de la señal son importantes para la regulación apropiada de respuestas de células B.

Además, una gran proporción de células de lamina propia intestinal muestran señales de hibridación positiva con receptor zalfa11. Este tejido consiste en una población mezclada de células linfoides, incluyendo células CD4+ T activadas y células B activadas. La disfunción inmune, en particular la activación crónica de la respuesta inmune mucósica, juega un papel importante en la etiología de la enfermedad de Crohn y la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD); la respuesta anormal a y/o la producción de citoquinas proinflamatorias es también un factor del que se sospecha (Braegger *et al., Annals Allergy* 72: 135-141, 1994; Sartor RB *Am. J. Gastroenterol*. 92: 5S-11S, 1997). El Ligando de zalfa11 de concierto con IL-15 expande células NK de progenitores de médula ósea y aumenta la función efectora de células NK. El Ligando de zalfa11 también co-estimula células B maduras estimuladas con anticuerpos anti-CD40, pero inhibe la proliferación de células B a señales a través de IgM. El Ligando de zalfa11 aumenta la proliferación de células T de concierto con una señal a través del receptor de células T, y la sobreexpresión en ratones transgénicos conduce a linfopenia y una expansión de monocitos y granulocitos. Estos efectos pleyotrópicos del Ligando de zalfa11 sugieren que moléculas que antagonizan o se unen a Ligando de zalfa11, tales como las moléculas de la presente invención, pueden proporcionar utilidad terapéutica para un amplio intervalo de enfermedades procedentes de defectos en el sistema inmune, incluyendo (aunque sin limitarse a ellas) lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, enfermedad de Crohn, IBD y diabetes. Es importante señalar que estas enfermedades son el resultado de una red compleja de disfunción inmune (SLE, por ejemplo, es la manifestación de defectos en células T y B), y que las células inmunes dependen por interacción con otras para obtener una respuesta inmune eficaz. Por tanto, el Ligando de zalfa11 (o un antagonista del Ligando, tal como una molécula de la presente invención) que puede usarse para manipular más de un tipo de célula inmune es un candidato terapéutico atractivo para intervención en fases múltiples de la enfermedad.

De modo similar, la distribución en tejidos del mARN correspondiente al cADN del receptor IL-2Rγ muestra expresión en células hematopoyéticas y linfoides, incluyendo células CD4+ T, células CD8+ T, células CD20+ B, células CD56+ NK, monocitos CD14+, así como granulocitos. El cADN de receptor IL-2Rγ no se encuentra generalmente en otros tipos de células, incluyendo células epiteliales y células de fibroblastos. El modelo de expresión de este receptor está correlacionado con las actividades del Ligando de zalfa11 y la localización del receptor zalfa11. Además, anticuerpos para el receptor IL-2Rγ disminuyen o erosionan el efecto del Ligando de zalfa11 en células B y células BaF3/receptor zalfa11, demostrando que el receptor zalfa11 y el receptor IL-2Rγ pueden heterodimerizarse *in vivo* e *in vitro*.

El Ligando de zalfa11 promueve la expansión de poblaciones de células NK de médula ósea y regula la proliferación de células T y B maduras en respuesta a estímulos activadores. El Ligando de zalfa11 actúa a través de un complejo receptor que incluye al menos una subunidad de receptor zalfa11 y la subunidad γ_c de IL2R, incluso aunque el dominio citoplásmico del receptor zalfa11 sea capaz de transducir señal en una configuración heterodímera (Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº 09/522.217 de propiedad común). IL4Rα también es capaz de señalización como homodímero (Kammer, W. *et al*., J. Biol. Chem. 271: 23634-23637, 1996), aunque el verdadero complejo receptor funcional de IL4 es un heterodímero de IL4Rα/γ_c. La señalización en BaF3/receptor zalfa11 podría haber resultado de interacciones del receptor zalfa11 humano con γ_c de ratón endógena, y los presentes Ejemplos muestran que anticuerpos para la subunidad γ_c disminuyen la señalización de Ligando de zalfa11 en estas células.

Además, se ha estudiado con detalle el receptor de IL2 y está compuesto por un heterotrímero α-β-γ_c. Las subunidades β y γ_c son ambas esenciales para transducción de señal y son miembros de la superfamilia de receptores de hematopoyetina (Cosman, D., *Cytokine* 5: 95-106, 1993), mientras que la subunidad α parece estar implicada principalmente en conversión de unión de alta afinidad y es distinta estructuralmente de la familia de receptores de hematopoyetina. Se ha mostrado que la subunidad γ_c participa para formar los receptores para IL4, IL7, IL9 e IL15, además de IL2 (para un examen, véase Sugamura, K. *et al., Ann. Rev. Immunol*. 14: 179-205, 1996), y se ha mostrado que mutaciones nulas en el gen de γ_c causan inmunodeficiencia combinada grave enlazada a X (X-SCID) (Noguchi, M. *et al., Cell* 73: 147-157, 1993).

El antagonismo del Ligando de zalfa11 de la proliferación de células B anti-IgM e inducidas por IL4 (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217, y ejemplos de ella) puede ser debido a la competición por γ_c; sin embargo, está claro que IL4 puede señalar a través de un receptor independiente de γ_c (IL4Rα + IL13Rα') (Murata, T. *et al., Blood* 91: 3884-3891, 1998). Las células B de pacientes humanos con SCID proliferan normalmente en respuesta a anti-IgM e IL4 (Matthews, D.J. *et al*., Blood 85: 38-42, 1995), y la capacidad de respuesta a IL4 en células B humanas normales está asociada con la capacidad de respuesta a IL13 y niveles de IL13R (Ford, D. *et al., J. Immunol*. 163: 3185-3193, 1999). De modo similar, el Ligando de zalfa11 puede señalar a través de un complejo heterodímero, heterotrímero o multímero que incluye receptor zalfa11 y una subunidad no γ_c. Como tales, la presente invención considera antagonistas heterodímeros de receptor zalfa11 soluble y agentes de unión al Ligando de zalfa11 que no incluyen la subunidad γ_c, pero incluyen una subunidad de citoquina Clase I adicional, por ejemplo, IL13Rα' y similares.

Los receptores solubles de la presente invención son útiles como antagonistas de la citoquina de Ligando de zalfa11. Tales efectos antagonistas pueden conseguirse por neutralización directa o unión del Ligando de zalfa11. Además de usos antagonistas, los receptores solubles de la presente invención pueden unirse a Ligando de zalfa11 y actuar como proteínas vehículo para la citoquina de Ligando de zalfa11, con el fin de transportar el Ligando a diferentes tejidos, órganos y células dentro del cuerpo. Como tales, los receptores solubles de la presente invención pueden fusionarse o acoplarse a moléculas, polipéptidos o restos químicos que dirigen el complejo receptor soluble-Ligando a un lugar específico, tal como un tejido, célula inmune específica o tumor. Así, los receptores solubles de la presente invención pueden usarse para dirigir específicamente la acción del Ligando de zalfa11. Véase Cosman, D. *Cytokine* 5: 95-106, 1993; y Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 9: 497-513, 2000.

Además, los receptores solubles de la presente invención pueden usarse para estabilizar al Ligando de zalfa11, para aumentar la bio-disponibilidad, la longevidad terapéutica y/o la eficacia del Ligando estabilizando al Ligando de degradación o liquidación, o fijando el objetivo del ligando a un lugar de acción dentro del cuerpo. Por ejemplo, el complejo IL-6/IL-6R soluble de origen natural estabiliza IL-6 y puede señalar a través del receptor de gp130. Véase Cosman, D. *supra* y Fernandez-Botran, R. *supra*.

Por ejemplo, el Ligando de zalfa11 será útil para tratar génesis de tumores, y sería útil por tanto en el tratamiento de cáncer. El Ligando de zalfa11 inhibe la proliferación estimulada por IL-4 de células B normales estimuladas por anti-IgM y se observa un efecto similar en linajes tumorales de células B, sugiriendo que puede haber beneficio terapéutico para tratar pacientes con el Ligando de zalfa11 con el fin de inducir las células tumorales de células B a un estado menos proliferativo. El ligando podría administrarse en combinación con otros agentes ya en uso, incluyendo agentes quimioterapéuticos convencionales así como moduladores inmunes tales como interferón alfa. Los interferones alfa/beta se han mostrado eficaces para tratar algunas leucemias y modelos de enfermedad de animales, y los efectos inhibidores del crecimiento de interferón-alfa y Ligando de zalfa11 son aditivos para al menos un linaje celular derivado de tumores de células B. Además, la estabilización del Ligando de zalfa11 o la capacidad para fijar el objetivo del Ligando a lugares específicos de acción con los receptores solubles de la presente invención sería deseable en este empeño terapéutico.

La presente invención proporciona un método para reducir la proliferación de células B o T neoplásticas que comprende administrar a un mamífero con un neoplasma de células B o T una cantidad de una composición de antagonista de Ligando de zalfa11, tal como los receptores solubles de la presente invención, suficiente para reducir la proliferación de las células B o T neoplásticas. En otras realizaciones, la composición puede comprender al menos otra citoquina seleccionada del grupo constituido por IL-2, IL-15, IL-4, GM-CSF, ligando de Flt3 o factor de células estaminales. Además, el antagonista de Ligando de zalfa11 puede ser una fusión tóxica. De manera similar, las fusiones receptor soluble-tóxico y los receptores solubles de la presente invención pueden usarse para reducir la proliferación de neoplasmas linfoides y hematopoyéticos que sobreexpresan o crecen en respuesta a Ligando de zalfa11. Además, los efectos indirectos de los receptores solubles de la presente invención pueden modular la función de células NK inducida por Ligando de zalfa11, y por ello aumentar indirectamente la destrucción de células tumorales.

La presente invención proporciona moléculas de polinucleótidos, incluyendo moléculas de ADN y ARN que codifican los polipéptidos de receptor zalfa11 heterodímero descritos aquí. Los expertos en la técnica reconocerán que, a la vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas de polinucleótidos. La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de ADN degenerada que abarca todos los ADNs que codifican el polipéptido de receptor zalfa11 soluble de SEQ ID NO: 6. La SEQ ID NO: 66 es una secuencia de ADN degenerada que abarca todos los ADNs que codifican el polipéptido de receptor zalfa11 soluble de SEQ ID NO: 69. La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN degenerada que abarca todos los ADNs que codifican el polipéptido de IL-2Rγ

humano soluble de SEQ ID NO: 4. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia degenerada de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 8 proporciona también todas las secuencias de ARN que codifican SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 4 respectivamente sustituyendo U por T. Así, se consideran por la presente invención polinucleótidos que codifican polipéptido de zalfa11 que comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 654 de SEQ ID NO: 7 o que comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 741 de SEQ ID NO: 66, polinucleótidos que codifican polipéptido de IL-2Rγ humano soluble que comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 696 de SEQ ID NO: 8, y sus equivalentes de ARN. La Tabla 1 señala los códigos de una letra usados dentro de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 8 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. "Resoluciones" son los nucleótidos indicados por una letra del código. "Complemento" indica el código para el(los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

TABLA 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A|G	Y	C|T
Y	C|T	R	A|G
M	A|C	K	G|T
K	G|T	M	A|C
S	C|G	S	C|G
W	A|T	W	A|T
H	A|C|T	D	A|G|T
B	C|G|T	V	A|C|G
V	A|C|G	B	C|G|T
D	A|G|T	H	A|C|T
N	A|C|G|T	N	A|C|G|T

Los codones degenerados usados en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 8 abarcan todos los codones posibles para un aminoácido dado, se indican en la Tabla 2.

TABLA 2

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

Un experto ordinario en la técnica apreciará que se introduce alguna ambiguedad al determinar un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Así, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto ordinario en la técnica puede identificar fácilmente tales secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 4. Puede ensayarse fácilmente la funcionalidad de secuencias variantes como se describe aquí.

Un experto ordinario en la técnica apreciará también que diferentes especies pueden presentar "utilización de codón preferencial". En general, véase Grantham *et al., Nuc. Acids Res.* 8: 1893-912, 1980; Haas *et al. Curr. Biol.* 6: 315-

24, 1996; Wain-Hobson *et al., Gene* 13: 335-64, 1981; Grosjean y Fiers, *Gene* 18: 199-209, 1982; Holm, *Nuc. Acids Res*. 14: 3075-87, 1986; Ikemura, *J. Mol. Biol*. 158: 573-97, 1982. Según se usa aquí, la expresión "utilización de codón preferencial" o "codones preferenciales" es una expresión de la técnica que se refiere a codones de traducción de proteínas que se usan más frecuentemente en células de una cierta especie, favoreciendo así a uno o unos pocos representativos de los posibles codones que codifican cada aminoácido (véase Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido Treonina (Thr) puede codificarse por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células de mamíferos ACC se el codón usado más comúnmente; en otras especies, por ejemplo, células de insectos, levadura, virus o bacterias, pueden ser preferenciales diferentes codones de Thr. Los codones preferenciales para una especie particular pueden introducirse en los polinucleótidos de la presente invención por una variedad de métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en ADN recombinante puede, por ejemplo, aumentar la producción de la proteína haciendo más eficaz la traducción de proteínas dentro de un tipo o especie de células particular. Por tanto, la secuencia de codón degenerado descrita en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 8 sirve como plantilla para optimizar la expresión de polinucleótidos y polipéptidos en diversos tipos y especies de células usados comúnmente en la técnica y descritos aquí. Pueden ensayarse y optimizarse secuencias que contienen codones preferenciales para expresión en diversas especies, y ensayarse su funcionalidad como se describe aquí.

Dentro de realizaciones preferidas de la invención, los polinucleótidos aislados se hibridan a regiones de tamaño similar de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 68 o SEQ ID NO: 3, o una secuencia complementaria de ellas, en condiciones rigurosas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5ºC más baja que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia objetivo se hibrida a una sonda emparejada perfectamente. Se conocen en la técnica numerosas ecuaciones para calcular T_m, y son específicas para ADN, ARN e híbridos ADN-ARN, y secuencias de sondas de longitud variable (véase, por ejemplo, Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel *et al*. (reds.) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (reds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 26: 227 (1990)). Un software de análisis de secuencias tal como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como lugares en Internet, son herramientas disponibles para analizaqr una secuencia dada y calcular T_m en base a criterios definidos por el usuario. Tales programas también pueden analizar una secuencia dada en condiciones definidas e identificar secuencias de sondas adecuadas. Típicamente, la hibridación de secuencias de polinucleótidos más largas (por ejemplo, >50 pares de bases) se realiza a temperaturas de aproximadamente 20-25ºC por debajo de la T_m calculada. Para sondas más pequeñas (por ejemplo, <50 pares de bases) la hibridación se realiza típicamente a la T_m o 5-10ºC por debajo. Esto permite la proporción de hibridación máxima para híbridos ADN-ADN y ADN-ARN. Pueden conseguirse mayores grados de rigurosidad a temperaturas más bajas con adición de formamida, que reduce la T_m del híbrido aproximadamente 1ºC por cada 1% de formamida en la solución tampón. Unas condiciones de hibridación rigurosas adecuadas son equivalentes a una incubación de aproximadamente 5 h a toda la noche a aproximadamente 42ºC en una solución que comprende: aproximadamente 40-50% de formamida, hasta aproximadamente 6X de SSC, aproximadamente 5X de solución de Denhardt, de cero hasta aproximadamente 10% de sulfato de dextrano y aproximadamente 10-20 μg/ml de ADN vehículo disponible comercialmente desnaturalizado. Generalmente, tales condiciones rigurosas incluyen temperaturas de 20-70ºC y un tampón de hibridación que contiene hasta 6X SSC y 0-50% de formamida; la hibridación es seguida después por lavado de los filtros en hasta aproximadamente 2X SSC. Por ejemplo, una rigurosidad de lavado adecuada es equivalente a de 0,1X SSC a 2X SSC, 0,1% de SDS, entre 55ºC y 65ºC. Pueden usarse diferentes grados de riurosidad durante la hibridación y el lavado para conseguir una unión específica máxima a la secuencia objetivo. Típicamente, los lavados siguientes a la hibridación se realizan con grados crecientes de rigurosidad para separar sondas de polinucleótidos no hibridadas de complejos hibridados. La hibridación y las condiciones de lavado rigurosas dependen de la longitud de la sonda, reflejada en la T_m, la hibridación y las soluciones de lavado usadas, y se determinan empíricamente de manera rutinaria por un experto en la técnica.

Como se ha indicado previamente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los métodos para preparar ADN y ARN son muy conocidos en la técnica. En general, se aisla ARN de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de receptor zalfa11 o el ARN para el componente heterodímero del receptor, tal como IL-2Rγ, u otra clase de receptor de citoquina clase I. Tales tejidos y células se identifican por manchas de Northern (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5201, 1980), e incluyen PBLs, bazo, timo y tejidos linfoides, células Raji, linajes celulares de eritroleucemia humana (por ejemplo, TF-1), linajes celulares de leucemia monocítica aguda, otros linajes celulares linfoides y hematopoyéticos y similares, para el receptor zalfa11. Puede aislarse de células linfoides, tales como las descritas antes, y otras células y tejidos como es conocido en la técnica para estos receptores, ARN para un componente heterodímero del receptor, tal como IL-2Rγ, u otro receptor de citoquina clase I. Puede prepararse ARN total usando extracción con isotiocianato de guanidinio seguida por aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al., Biochemistry* 18: 52-94, 1979). Se prepara ARN de poli $(A)^+$ a partir de ARN total usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-12, 1972). Se prepara ADN complementario (cADN) a partir de ARN de poli $(A)^+$ usando métodos conocidos. Como alternativa, puede aislarse ADN genómico. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de zalfa11 se identifican y aislan después mediante, por ejemplo, hibridación o reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Mullis, Patente de los EE.UU. Nº 4.683.202).

Los polinucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse también usando máquinas de síntesis de ADN. Actualmente el método de elección es el método de fosforamidita. Si se requiere ADN de doble cadena sintetizado

químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un gen o fragmento de gen, cada cadena complementaria se hace separadamente. La producción de polinucleótidos cortos (60 a 80 pb) es técnicamente sencilla y puede conseguirse sintetizando las cadenas complementarias y reasociándolas después. Sin embargo, para producir polinucleótidos más largos (>300 pb), se emplean habitualmente estrategias especiales, porque la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN es raramente 100%. Para superar este problema, se montan genes sintéticos (de doble cadena) en forma modular a partir de fragmentos de cadena sencilla que son de una longitud de 20 a 100 nucleótidos.

Una forma alternativa para preparar un gen de longitud completa es sintetizar un grupo especificado de oligonucleótidos solapantes (40 a 100 nucleótidos). Después de reasociar las regiones complementarias solapantes cortas 3' y 5' (6 a 10 nucleótidos), quedan todavía grandes huecos, pero las regiones de pares de bases cortas son de longitud suficiente y suficientemente estables para sostener la estructura junta. Se llenan los huecos y se completa el dúplex de ADN mediante síntesis enzimática de ADN por polimerasa I de ADN de *E. coli*. Tras completarse la síntesis enzimática, se cierran los cortes con ligasa de ADN T4. Se enlazan secuencialmente entre sí construcciones de doble cadena para formar la secuencia génica completa que se verifica por análisis de secuencia de ADN. Véase Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, (ASM Press, Washington, D.C. 1994); Itakura *et al., Annu. Rev. Biochem.* 53: 323-56, 1984 y Climie *et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 87: 633-7, 1990. Además, se añaden generalmente otras secuencias que contienen señales para iniciación y terminación apropiadas de la transcripción y traducción.

La presente invención proporciona además polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, aunque sin limitarse a ellas, mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies vertebradas e invertebradas. Son de particular interés complejos receptores solubles heterodímeros que combinan receptor zalfa11 soluble e IL-2Rγ humano soluble u otros polipéptidos de receptores de citoquina Clase I solubles de otras especies de mamíferos, incluyendo polipéptidos de ratón, porcino, ovino, bovino, canino, felino, equino y otros de primate. Pueden clonarse ortólogos conocidos y desconocidos de receptor zalfa11 soluble humano e IL-2Rγ humano soluble u otros receptores de citoquina Clase I solubles usando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, puede clonarse un cADN usando mARN obtenido de un tipo de tejido o célula, tal como células linfoides, que expresa receptor zalfa11, IL-2Rγ humano u otros receptores de citoquina Clase I. Además, pueden identificarse fuentes adecuadas de mARN sondando manchas de Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas aquí. Se prepara después una genoteca a partir de mARN de un tejido o linaje celular positivo. Puede aislarse después un cADN que codifica zalfa11 mediante una variedad de métodos, tales como sondando con un cADN humano completo o parcial o con uno o más grupos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. Puede clonarse también un cADN usando PCR (Mullis, *supra*), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zalfa11 humano representativo, o o la secuencia de IL-2Rγ humano soluble, descritas aquí. Dentro de un método adicional, la genoteca de cADN puede usarse para transformar o transfectar células hospedantes, y puede detectarse la expresión del cADN de interés con un anticuerpo de polipéptido de zalfa11. Pueden aplicarse también técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

Las subunidades de receptor de citoquina se caracterizan por una estructura multi-dominios que comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana que ancla al polipéptido en la membrana celular y un dominio intracelular. El dominio extracelular del receptor zalfa11 es un dominio de unión a ligando, que une Ligando de zalfa11, y el dominio intracelular es un dominio efector implicado en transducción de señal, aunque las funciones de unión a ligando y efectora pueden residir en subunidades separadas de un receptor multímero. El dominio de unión a ligando puede ser él mismo una estructura multi-dominios. Los receptores multímeros incluyen homodímeros (por ejemplo, isoformas $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ de receptor de PDGF, receptor de eritropoyetina, MPL y receptor de G-CSF), heterodímeros cuyas subunidades tiene cada una dominios de unión a ligando y efector (por ejemplo, isoforma $\alpha\beta$ de receptor de PDGF), y multímeros que tienen subunidades componentes con funciones dispares (por ejemplo, receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15 y GM-CSF). Algunas subunidades de receptor son comunes a una pluralidad de receptores. Por ejemplo, la subunidad AIC2B, que no puede unirse a ligando por sí misma pero incluye un dominio de transducción de señal intracelular, es un componente de receptores de IL-3 y GM-CSF. Muchos receptores de citoquina pueden situarse en una de las cuatro familias relacionadas sobre la base de la estructura y función. Los receptores hematopoyéticos, por ejemplo, se caracterizan por la presencia de un dominio que contiene residuos de cisteína conservados y el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13). Se ha examinado la estructura del receptor de citoquina por Urdal, *Ann. Reports Med. Chem.* 26: 221-228, 1991; y Cosman, *Cytokine* 5: 95-106, 1993. Bajo una presión selectiva para que adquieran organismos nuevas funciones biológicas, surgen probablemente nuevos miembros de la familia de receptores de la duplicación de genes de receptores existentes que conducen a la existencia de familias multi-genes. Los miembros de la familia contienen así vestigios del gen ancestral, y estos aspectos característicos pueden explotarse en el aislamiento e identificación de miembros de la familia adicionales. Así, la superfamilia de receptores de citoquina se subdivide en varias familias, por ejemplo, la familia de inmunoglobulina (incluyendo receptores de CSF-1, MGF, IL-1 y PDGF); la familia de hematopoyetina (incluyendo subunidad β de receptor de IL-2, subunidad α de receptor de GM-CSF, subunidad β de receptor de GM-CSF; y receptores de G-CSF, EPO, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15); la familia de receptores de TNF (incluyendo receptores de TNF (p80) TNF (p60), CD27, CD30, CD40, Fas y receptor de NGF).

El análisis de la secuencia del receptor zalfa11 sugiere que es un miembro de la misma subfamilia de receptores que la subunidad β de receptor de IL-2, los receptores de IL-4 e IL-9. Ciertos receptores de esta subfamilia (por ejemplo, EPO-R o MPL) se asocian para formar homodímeros que transducen una señal. Otros miembros de la subfamilia (por

ejemplo, receptores de IL-6, IL-11 y LIF) se combinan con una segunda subunidad (denominada una subunidad β) para unirse a ligando y transducir una señal. Subunidades β específicas se asocian con una pluralidad de subunidades de receptor de citoquina específicas. Por ejemplo, la subunidad β gp130 (Hibi *et al., Cell* 63: 1149-1157, 1990) se asocia con subunidades de receptor específicas para IL-6, IL-11 y LIF (Gearing *et al., EMBO J*. 10: 2839-2848, 1991; Gearing *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.284.755). La oncostatina M se une a un heterodímero de receptor de LIF y gp130. CNTF se une a receptores trímeros que comprenden receptor de CNTF, receptor de LIF y subunidades gp130. Además, IL-4 e IL-13 obtienen respuestas a través de los receptores de IL-4 e IL-13 actuando sobre diversos complejos receptores heterodímeros funcionales, por ejemplo, con y sin la subunidad γ_c, y tales complejos receptores heterodímeros pueden afectar si las citoquinas actúan sobre células hematopoyéticas o no hematopoyéticas (Andersson, A. *et al., Eur. J. Immunol*. 27: 1762-1768, 1997; Murata T. *et al., Blood* 10: 3884-3891, 1998). Además, la afinidad de unión de IL-4 en su receptor es aumentada cuando la subunidad γ_c del complejo IL4R es sustituida por una subunidad IL-13Rα' (Murata, T. *et al., supra*). Así, los receptores solubles de la presente invención incluyen homodímeros de receptor zalfa11; y heterodímeros que tienen un componente de receptor zalfa11, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble o receptor zalfa11 soluble heterodimerizado con otro receptor de citoquina Clase I soluble, tal como IL-13Rα (SEQ ID NO: 84), IL-13Rα' (SEQ ID NO: 82) o una subunidad de receptor de IL-15 (SEQ ID NO: 86).

Por ejemplo, los receptores solubles de citoquina Clase I adecuados que pueden heterodimerizarse con un componente de receptor zalfa11 soluble (por ejemplo, SEQ ID NO: 6), incluyen un receptor soluble para IL-13Rα como se muestra en SEQ ID NO: 84, IL-13Rα' como se muestra en SEQ ID NO: 82 o IL-15 como se muestra en SEQ ID NO: 86. Además, pueden usarse sub-fragmentos funcionales, tales como fragmentos de unión a citoquina mínimos, de estos receptores solubles de citoquina Clase I. Tales fragmentos funcionales incluyen 1 a 322, 7 a 322 y 105 a 322 de SEQ ID NO: 82, 1 a 317, 10 a 317 y 105 a 317 de SEQ ID NO: 84, y 1 a 173 de SEQ ID NO: 86. Las secuencias de polinucleótidos correspondientes son como se muestra en SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 85 respectivamente. Está bien dentro del nivel de un experto en la técnica definir qué secuencias de una secuencia de citoquina clase I conocida comprenden el dominio de unión a citoquina extracelular exento de un dominio transmembrana y dominio intracelular.

Se ha identificado una secuencia de polinucleótido para el ortólogo de ratón de receptor zalfa11 humano y se muestra en SEQ ID NO: 11, y la correspondiente secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 12. El análisis del polipéptido de zalfa11 de ratón codificado por la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 11 reveló un marco de lectura abierto que codifica 529 aminoácidos (SEQ ID NO: 12) que comprende un péptido de señal secretora predicho de 19 residuos de aminoácidos (residuo 1 (Met) a residuo 19 (Ser) de SEQ ID NO: 12), y un polipéptido maduro de 510 aminoácidos (residuo 20 (Cys) a residuo 529 (Ser) de SEQ ID NO: 2). Además del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) correspondiente a los residuos 214 a 218 de SEQ ID NO: 12, el receptor comprende un dominio de unión a citoquina de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos (residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 12); un dominio enlazador (residuos 120 (Pro) a 123 (Pro) de SEQ ID NO: 12); una región de cadena penúltima (residuos 192 (Lys) a 202 (Ala) de SEQ ID NO: 12); un dominio transmembrana (residuos 238 (Met) a 254 (Leu) de SEQ ID NO: 12); un dominio de señalización intracelular completo (residuos 255 (Lys) a 529 (Ser) de SEQ ID NO: 12) que contiene un lugar de señalización "Caja I" (residuos 266 (Ile) a 273 (Pro) de SEQ ID NO: 12) y un lugar de señalización "Caja II" (residuos 301 (Ile) a 304 (Val) de SEQ ID NO: 2). Una comparación de las secuencias de aminoácidos humana y de ratón revela que los polipéptidos humano y ortólogo contienen aspectos estructurales descritos antes. La secuencia madura para el zalfa11 de ratón comienza en Cys_{20} (como se muestra en SEQ ID NO: 12), que corresponde a Cys_{20} (como se muestra en SEQ ID NO: 2) en la secuencia humana. Hay una identidad de aproximadamente el 69% entre las secuencias de zalfa11 de ratón y humana sobre el dominio de unión a citoquina extracelular correspondiente a los residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 6) y los residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 12. Las identidades porcentuales anteriores se determinaron usando un programa FASTA con ktup=1, penalización de abertura de hueco=12, penalización de extensión de hueco=2 y matriz de sustitución=BLOSUM62, fijando como defecto otros parámetros del programa FASTA. Los polinucleótidos correspondientes que codifican las regiones, dominios, motivos, residuos y secuencias de polipéptido de zalfa11 de ratón descritos antes son como se muestra en SEQ ID NO: 11.

La presente invención proporciona también un receptor soluble heterodímero, en el que el polipéptido de receptor zalfa11 soluble aislado allí es sustancialmente similar a los polipéptidos de SEQ ID NO: 6 y sus ortólogos. Además, en una realización preferida, la presente invención proporciona también un receptor soluble heterodímero, en el que el polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble aislado allí es sustancialmente similar a los polipéptidos de SEQ ID NO: 4 y sus ortólogos. La expresión "sustancialmente similar" se usa aquí para indicar polipéptidos que tienen al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 6 o sus ortólogos. Tales polipéptidos serán más preferiblemente al menos 90% idénticos, y aún más preferiblemente 95% o más idénticos a SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 4 o sus ortólogos. La identidad de secuencias porcentual se determina por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al., Bull. Math. Bio*. 48: 603-616, 1986 y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919, 1992. Brevemente, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de abertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (*ibid*.) como se muestra en la Tabla 3 (se indican aminoácidos por los códigos de una letra estándares). Se calcula después la identidad porcentual como:

$$\frac{\text{Número total de parejas idénticas}}{\text{[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias]}} \times 100$$

TABLA 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

La identidad de secuencias de moléculas de polinucleótidos se determina por métodos similares usando una relación como se ha descrito antes.

Los expertos en la técnica aprecian que hay muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos descrita aquí y la secuencia de aminoácidos de una variante putativa zsig57. El algoritmo FASTA se describe por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol*. 183: 63 (1990).

Brevemente, FASTA caracteriza primero la similitud de secuencias identificando regiones compartidas por la secuencia en duda (por ejemplo, SEQ ID NO: 6) y una secuencia de ensayo, que tienen la más alta densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservadoras. Se vuelven a puntuar las diez regiones con la más alta densidad de identidades comparando la similitud de todos los aminoácidos pareados usando una matriz de sustitución de aminoácidos, y los extremos de las regiones se "arreglan" para incluir sólo aquellos residuos que contribuyen a la puntuación más alta. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de "corte" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor de ktup), se examinan las regiones iniciales arregladas para determinar si las regiones pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones con puntuación más alta de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol*. 48: 444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math*. 26: 787 (1974)), que permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Los parámetros del programa preferidos para análisis FASTA son: ktup=1, penalización de abertura de hueco=10 y penalización de extensión de hueco=1, y matriz de sustitución=BLOSUM62, fijándose otros parámetros como defecto. Estos parámetros del programa FASTA pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX") como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, *Meth. Enzymol*. 183: 63 (1990).

También puede usarse FASTA para determinar la identidad de secuencias de moléculas de ácidos nucleicos usando una relación como se ha descrito antes. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar de uno a seis, preferiblemente de tres a seis, más preferiblemente tres, con otros parámetros del programa fijados como defecto.

La Tabla de BLOSUM62 (Tabla 3) es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regines altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89*: 10915 (1992)). Por consiguiente pueden usarse las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 para definir sustituciones de aminoácidos conservadoras que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en propiedades químicas (como se discute después), la expresión "sustituciones de aminoácidos conservadoras" se refiere preferiblemente a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 mayor de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. Según este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservadoras preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservadoras más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3).

Los polipéptidos de zalfa11 variantes o polipéptidos de zalfa11 sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de pequeña naturaleza, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras (véase Tabla 4) y otras sustituciones que no afectan significativamente al pliegue o actividad del polipéptido; pequeñas supresiones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una etiqueta de afinidad. La presente invención incluye así polipéptidos de receptor soluble zalfa11 de alrededor de 190 a aproximadamente 245 residuos de aminoácidos que comprenden una secuencia que es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente 95% o más idéntica a la región correspondiente de SEQ ID NO: 6. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender además un lugar de división proteolítica entre el polipéptido de zalfa11 y la etiqueta de afinidad. Los lugares adecuados incluyen lugares de división por trombina y lugares de división por factor Xa.

TABLA 4

Sustituciones de aminoácidos conservadoras

Básicos:	arginina
	lisina
	histidina
Ácidos:	ácido glutámico
	ácido aspártico
Polares:	glutamina
	asparagina
Hidrófobos:	leucina
	isoleucina
	valina
Aromáticos:	fenilalanina
	triptófano
	tirosina
Pequeños:	glicina
	alanina
	serina
	treonina
	metionina

La presente invención proporciona además una variedad de otras fusiones de polipéptidos y proteínas multímeras relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptidos. Por ejemplo, puede prepararse un receptor zalfa11 soluble o un polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ, como una fusión a una proteína dimerizante como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nº 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes preferidas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, IgGγ1, y la cadena ligera κ humana. El receptor zalfa11 soluble en inmunoglobulina o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble en inmunoglobulina, tal como fusiones zalfa11/IL-2Rγ solubles en inmunoglobulina, pueden expresarse en células diseñadas genéticamente para producir una variedad de análogos de receptor zalfa11 multímeros. Pueden fusionarse dominios auxiliares a receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, para ponerlos como objetivo células, tejidos o macromoléculas específicos (por ejemplo, colágeno o células que expresan el Ligando de zalfa11). Un polipéptido de zalfa11 puede fusionarse a dos o más restos, tales como una etiqueta de afinidad para purificación y un dominio de fijación de objetivo. Las fusiones de polipéptidos también pueden comprender uno o más lugares de división, particularmente entre dominios. Véase Tuan *et al., Connective Tissue Research* 34: 1-9, 1996.

Las proteínas de la presente invención también pueden comprender residuos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *ter*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalnina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios métodos en la técnica para incorporar en proteínas residuos de aminoácidos de origen no natural. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que se suprimen mutaciones sin sentido usando tARNs supresores aminoacilados químicamente. Los métodos para sintetizar aminoácidos y tARN aminoacilante son conocidos en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realizan en un sistema exento de células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles comercialmente y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al., J. Am. Chem. Soc*. 113: 2722, 1991; Ellman *et al., Methods Enzymol*. 202: 301, 1991; Chung *et al., Science* 259: 806-9, 1993; y Chung *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10145-9, (1993). En un segundo método, se realiza traducción en oocitos de *Xenopus* por microinyección de mARN mutado y tARNs supresores aminoacilados químicamente (Turcatti *et al., J. Biol. Chem*. 271: 1991-8, 1996). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que ha de sustituirse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia de aminoácido(s) de origen no natural deseado(s) (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora a la proteína en lugar de su pareja natural. Véase Koide *et al., Biochem*. 33: 7470-7476, 1994. Los residuos de aminoácidos de origen natural pueden convertirse en especies de origen no natural por modificaciones químicas *in vitro*. Puede combinarse modificación química con mutagénesis dirigida al lugar para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci*. 2: 395-403, 1993).

Pueden sustituirse residuos de aminoácidos de zalfa11 por un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales.

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al lugar o mutagénesis de escaneo de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-5, 1989; Bass *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498-502, 1991). En la última técnica, se introducen en cada residuo de la molécula mutaciones de alanina simples, y se ensaya la actividad biológica de las moléculas mutantes resultantes (por ejemplo, unión a ligando y transducción de señal) como se describe después para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también Hilton *et al., J. Biol. Chem*. 271: 4699-4708, 1996. También pueden determinarse lugares de ligando-receptor, proteína-proteína u otra interacción biológica por análisis físico de la estructura, determinada por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcado por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos del lugar de contacto putativos. Véase, por ejemplo, de Vos *et al*., Science 255: 306-312, 1992; Smith *et al., J. Mol. Biol*. 224: 899-904, 1992; Wlodaver *et al., FEBS Lett*. 309: 59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales pueden inferirse también de análisis de homologías con receptores relacionados.

Puede definirse la determinación de residuos de aminoácidos que están dentro de regiones o dominios que son críticos para mantener la integridad estructural. Dentro de estas regiones, pueden determinarse residuos específicos que serán más o menos tolerantes al cambio y mantener la estructura terciaria total de la molécula. Los métodos para analizar una estructura de secuencia incluyen, aunque sin limitarse a ellos, alineamiento de secuencias múltiples con alta identidad de aminoácidos o nucleótidos y análisis con ordenador usando software disponible (por ejemplo, el visor Insight II® y herramientas de modelado de homología; MSI, San Diego, CA), propensiones de estructuras secundarias, modelos binarios, empaquetado complementario e interacciones polares enmascaradas (Barton, *Current Opin. Struct. Biol*. 5: 372-376, 1995; y Cordes *et al., Current Opin. Struct. Biol*. 6: 3-10, 1996). En general, cuando se diseñan modificaciones de moléculas o se identifican fragmentos específicos, la determinación de la estructura vendrá acompañada por evaluación de la actividad de las moléculas modificadas.

Se hacen cambios de las secuencias de aminoácidos en receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, para minimizar la ruptura de una estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. Por ejemplo, cuando el receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11

soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, comprende una o más hélices, se harán cambios en residuos de aminoácidos para no romper la geometría de la hélice y otros componentes de la molécula en los que cambios de conformación disminuyen alguna función crítica, por ejemplo, unión de la molécula al Ligando de zalfa11 o antagonismo de la actividad de Ligando de zalfa11. Los efectos de cambios de la secuencia de aminoácidos pueden predecirse, por ejemplo, mediante modelado por ordenador como se ha descrito antes o determinarse por análisis de estructura de cristales (véase, por ejemplo, Lapthorn *et al., Nat. Struct. Biol*. 2: 266-268, 1995). Otros métodos que son muy conocidos en la técnica comparan el pliegue de una proteína variante con una molécula patrón (por ejemplo, la proteína nativa). Por ejemplo, puede hacerse una comparación del modelo de cisteína en moléculas variante y patrón. La espectrometría de masas y la modificación química usando reducción y alquilación proporcionan métodos para determinar residuos de cisteína que están asociados con enlaces disulfuro o están exentos de tales asociaciones (Bean *et al., Anal. Biochem*. 201: 216-226, 1992; *Gray, Protein Sci*. 2: 1732-1748, 1993; y Patterson *et al., Anal. Chem*. 66: 3727-3732, 1994). Se cree generalmente que si una molécula modificada no tiene el mismo modelo de enlaces disulfuro que la molécula patrón, se afectaría al pliegue. Otro método muy conocido y aceptado para medir el pliegue es dicrosismo circular (CD). La medición y comparación de los espectros de CD generados por una molécula modificada y una molécula patrón son rutinarios (Johnson, *Proteins* 7: 205-214, 1990). La cristalografía es otro método muy conocido para analizar pliegue y estructura. La resonancia magnética nuclear (NMR), la representación de péptidos digestivos y la representación de epítopes son también métodos conocidos para analizar pliegue y similitudes estructurales entre proteínas y polipéptidos (Schaanan *et al., Science* 257: 961-964, 1992).

Puede generarse un perfil de hidrofilicidad de Hopp/Woods de la secuencia de proteína de zalfa11 como se muestra en SEQ ID NO: 6 (Hopp *et al., Proc. Natl. Acad. Sci*. 78: 3824-3828, 1981; Hopp, *J. Immun. Meth*. 88: 1-18, 1986, y Triquier *et al., Protein Engineering* 11: 153-169, 1998). El perfil se basa en una ventana de seis residuos deslizante. Se ignoraron residuos G, S y T enmascarados y residuos H, Y y W expuestos. Por ejemplo, en el receptor zalfa11 soluble, las regiones hidrófilas incluyen los residuos de aminoácidos 55 a 60 de SEQ ID NO: 2, los residuos de aminoácidos 56 a 61 de SEQ ID NO: 2, los residuos de aminoácidos 139 a 144 de SEQ ID NO: 2, y los residuos de aminoácidos 227 a 232 de SEQ ID NO: 2. Las regiones hidrófilas correspondientes en referencia a SEQ ID NO: 6 pueden hacerse con remisión a los anteriores residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Los expertos en la técnica reconocerán que se tendrán en cuenta la hidrofilicidad o hidrofobicidad cuando se diseñen modificaciones en la secuencia de aminoácidos de un receptor zalfa11 soluble o un polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, para no romper el perfil estructural y biológico total. Son de particular interés para la sustitución residuos hidrófobos seleccionados del grupo constituido por Val, Leu e Ile o el grupo constituido por Met, Gly, Ser, Ala, Tyr y Trp. Por ejemplo, los residuos tolerantes a sustitución podrían incluir residuos tales como se muestran en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 4. Sin embargo, podrían ser relativamente intolerantes a sustitución residuos de cisteína.

También pueden inferirse las identidades de aminoácidos esenciales del análisis de similitud de secuencias entre los miembros de la familia de receptores de citoquina Clase I con receptor zalfa11 soluble o receptor IL-2Rγ soluble. Usando métodos tales como el análisis "FASTA" descrito previamente, se identifican regiones de alta similitud dentro de una familia de proteínas y se usan para analizar secuencia de aminoácidos para regiones conservadas. Un método alternativo para identificar un polinucleótido de zalfa11 de dominio extracelular variante en base a la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un polinucleótido de zalfa11 variante potencial puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 68, como se ha comentado antes. De igual modo, pueden identificarse como se ha descrito antes variantes de receptor de citoquina clase I soluble contenidas dentro de un polipéptido heterodímero de zalfa11, tal como el componente de receptor IL-2Rγ soluble en zalfa11/IL-2Rγ soluble.

Otros métodos para identificar aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención son procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al lugar o mutagénesis de escaneo de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081, 1989; Bass *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4498, 1991), Coombs y Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (red.) páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En la última técnica, se introducen en cada residuo de la molécula mutaciones de alanina simples, y se ensaya la actividad biológica de las moléculas mutantes resultantes como se describe después para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también Holton *et al., J. Biol. Chem*. 271: 4699 (1996).

La presente invención incluye también fragmentos funcionales de polipéptidos de receptor zalfa11 solubles o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles y moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales fragmentos funcionales. Un polipéptido de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble "funcional", tal como polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble, o fragmento del mismo definido aquí se caracteriza por su capacidad para unirse a un anticuerpo anti-zalfa11, o a Ligando de zalfa11 (soluble o inmovilizado), o para antagonizar con la actividad de Ligando de zalfa11 en, por ejemplo, un ensayo biológico o de unión. Como se ha descrito aquí previamente, el receptor zalfa11 se caracteriza por una estructura de receptor de citoquina clase I. Así, la presente invención proporciona además proteínas de fusión que abarcan: (a) moléculas de polipéptido homodímero o multímero que comprenden un dominio extracelular descrito aquí; y (b) fragmentos funcionales que comprenden uno o más de estos dominios. La otra porción de polipéptido de la proteína de fusión puede ser contribuida por otro receptor de citoquina clase I, por ejemplo, IL-2Rγ, subunidad β de receptor de IL-2 y el receptor β-común (es decir, subunidades β de receptor IL3, IL5 y GM-CSF), subunidades de receptor de IL-13α, IL-13α' o IL-

15, o por un péptido de señal secretora no nativo y/o no relacionado que facilite la secreción de la proteína de fusión soluble.

Pueden realizarse análisis de supresión rutinarios de moléculas de ácidos nucleicos para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifique un receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Como ilustración, pueden digerirse moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o fragmentos de ella con nucleasa *Bal*31 para obtener una serie de supresiones encajadas. Estos fragmentos de ADN pueden insertarse en vectores de expresión en el marco de lectura apropiado, y los polipéptidos expresados se aislan y ensaya en ellos el antagonismo de la actividad biológica de Ligando de zalfa11 o de unión de Ligando de zalfa11; o la capacidad para unirse a anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble; o la capacidad de unión a Ligando de zalfa11. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es usar mutagénesis dirigida por oligonucleótido para introducir supresiones o codones de detención para especificar la producción de un fragmento de polipéptido deseado. Alternativamente, pueden sintetizarse fragmentos particulares de un receptor zalfa11 soluble o polinucleótido de polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble usando la reacción en cadena de polimerasa.

Son rutinarios para los expertos en la técnica métodos estándares para identificar dominios funcionales, tales como dominios de unión de Ligando. Por ejemplo, se han resumido estudios sobre la truncación en alguno o ambos términos de interferones por Horisberger y Di Marco, *Pharmac. Ther*. 66: 507 (1995). Además, se describen técnicas estándares para análisis funcional de proteínas, por ejemplo, por Treuter *et al., Molec. Eng. Genet*. 240: 113 (1993); Content *et al*., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", en *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantel (red.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", en *Control of Animal Cell Proliferation* 1, Boyinton *et al*. (reds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985); Coumailleau *et al., J. Biol. Chem*. 270: 29270 (1995); Fukunaga *et al., J. Biol. Chem*. 270: 25291 (1995), Yamaguchi *et al., Biochem. Pharmacol*. 50: 1295 (1995); y Meisel *et al., Plant Molec. Biol*. 30: 1 (1996).

Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos múltiples y ensayarse usando métodos conocidos de mutagénesis y examen, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Scie. USA* 86: 2152-2156, 1989). Brevemente, estos autores describen métodos para hacer aleatorias dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar un polipéptido funcional y determinar después la secuencia de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros métodos que pueden usarse incluyen exposición de fagos (por ejemplo, Lowman *et al., Biochem* 30: 10832-10837, 1991; Ladner *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/062045) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al., Gene* 46: 145, 1986; Ner *et al., DNA* 7: 127, 1988).

Pueden generarse variantes del ADN de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble y secuencias de polipéptidos mediante mezclado de ADN como se describe por Stemmer, *Nature* 370: 389-91, 1994, Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-51, 1994 y Publicación WIPO WO 97/20078. Brevemente, se general ANDs variantes por recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un ADN progenitor seguida por vuelta a reunir usando PCR, produciendo mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica puede modificarse usando una familia de ADNs progenitores, tales como variantes alélicas de ADNs de diferentes especies, para introducir en el procedimiento variabilidad adicional. La selección o examen de la actividad deseada, seguidos por iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona una "evolución" rápida de secuencias seleccionando mutaciones deseables mientras se selecciona simultáneamente contra cambios perjudiciales.

Pueden combinarse métodos de mutagénesis como se describen aquí con métodos de examen automatizados de alta capacidad para detectar actividad antagonista de Ligando de zalfa11 o de unión en células hospedantes de receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles mutagenizados, clonados. Los ensayos preferidos a este respecto incluyen ensayos de proliferación de células y ensayos de unión a ligando basados en biosensor, que se describen después en los Ejemplos. Pueden recuperarse de las células hospedantes moléculas de ADN mutagenizado que codifican receptores activos o porciones de ellos (por ejemplo, fragmentos de unión a ligando y similares), y determinarse rápidamente la secuencia usando equipo moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

La presente invención proporciona así una serie de nuevas moléculas híbridas en las que un segmento que comprende uno o más de los dominios del receptor zalfa11 soluble está fusionado a otro polipéptido de receptor soluble. La fusión se hace preferiblemente empalmandoal nivel de ADN para permitir la expresión de moléculas quiméricas en sistemas de producción recombinante. Se ensaya después en las moléculas resultantes propiedades tales como solubilidad mejorada, estabilidad mejorada, vida media de holgura prolongada, niveles de expresión y secreción mejorados y farmacodinámica. Tales moléculas híbridas pueden comprender además residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, un enlazador de polipéptido) entre las proteínas o polipéptidos componentes.

Usando los métodos discutidos aquí, un experto ordinario en la técnica puede identificar y/o preparar una variedad de fragmentos o variantes de polipéptidos de SEQ ID NO: 6 que conservan actividad de unión de Ligando de zalfa11 o antagonista. Por ejemplo, se puede hacer un receptor soluble zalfa11 preparando una variedad de polipéptidos que sean sustancialmente homólogos al dominio de unión de citoquina (residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO:

2 (SEQ ID NO: 6), o una subsecuencia de ellos que se una a Ligando de zalfa11 o variantes alélicas u ortólogos de especie de ellos) y conserven actividad de unión a ligando de la proteína de zalfa11 de tipo natural. Tales polipéptidos pueden incluir aminoácidos adicionales de, por ejemplo, parte o la totalidad de la secuencia de péptido señal, dominios transmembrana e intracelulares. Tales polipéptidos pueden incluir también segmentos de polipéptidos adicionales como se describe en general aquí tales como marcas, etiquetas de afinidad y similares. De igual modo, un experto ordinario en la técnica puede identificar y/o preparar una variedad de fragmentos de polipéptidos o variantes de SEQ ID NO: 4, u otros receptores de citoquina clase I solubles que formen heterodímeros con receptor zalfa11.

Para cualquier polipéptido de receptor zalfa11 soluble, incluyendo variantes y polipéptidos de fusión o proteínas, un experto ordinario en la técnica puede generar fácilmente una secuencia de polinucleótido totalmente degenerada que codifica esa variante usando la información indicada en las anteriores Tablas 1 y 2.

El receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles de la presente invención, incluyendo polipéptidos de receptor soluble de longitud completa, los fragmentos activos biológicamente y los polipéptidos de fusión pueden producirse en células hospedantes diseñadas genéticamente según técnicas convencionales. Las células hospedantes adecuadas son aquellos tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y hacerse crecer en cultivo, e incluyen bacterias, células de hongos y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Se describen técnicas para manipular moléculas de ADN clonado e introducir ADN exógeno en una variedad de células hospedantes como se describe por Sambrook *et al*., Molecular Cloning: *A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel *et al*., reds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de zalfa11 se enlaza operativamente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un promotor y un terminador de transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector contendrá también comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que, dentro de ciertos sistemas, pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados, y puede proporcionarse la replicación del ADN exógeno por integración en el genoma de la célula hospedante. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una materia de diseño rutinario dentro del nivel de la experiencia ordinaria en la técnica. Muchos de tales elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de suministradores comerciales.

Para dirigir un receptor zalfa11 soluble o un polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, en la trayectoria secretora de una célula hospedante, se proporciona en el vector de expresión una secuencia de señal secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o pre secuencia). La secuencia de señal secretora puede ser la de receptor zalfa11 descrito aquí, la IL-2Rγ (aminoácido 1 (Met) a 22 (Gly) de SEQ ID NO: 18), o puede derivarse de otra proteína segregada (por ejemplo, t-PA) o sintetizarse *de novo*. La secuencia de señal secretora está enlazada operativamente a la secuencia de ADN de zalfa11, es decir, las dos secuencias están unidas en el marco de lectura correcto y situadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado a la trayectoria secretora de la célula hospedante. Las secuencias de señales secretoras están situadas comúnmente 5' con la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias de señales secretoras pueden estar situadas en otra parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.037.743; Holland *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.143.830).

Células de mamífero cultivadas son hospedantes adecuados dentro de la presente invención. Los métodos para introducir ADN exógeno en células hospedantes de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler *et al., Cell* 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), electroporación (Neumann *et al., EMBO J*. 1: 841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al., ibid*), y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al*., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone *et al., Focus* 15: 80, 1993) y vectores víricos (Miller y Rosman, *BiuoTechniques* 7: 980-90, 1989, Wang y Finer, *Nature Med*. 2: 714-716, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se describe, por ejemplo, por Levinson *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.713.339; Hagen *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.784.950; Palmiter *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.579.821; y Ringold, Patente de los EE.UU. Nº 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen los linajes celulares de COS-1 (ATCC Nº CRL 1650), COS-7 (ATCC Nº CRL 1651), BHK (ATCC Nº CRL 1632), BHK 570 (ATCC Nº CRL 10314), 293 (ATCC Nº CRL 1573; Graham *et al., J. Gen Virol*. 36: 59.72, 1977) y de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1; ATcc Nº CCL 61). Se conocen en la técnica linajes celulares adecuados adicionales y están disponibles en depósitos públicos tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, se prefieren promotores de transcripción fuertes, tales como promotores de SV-40 o citomegalovirus (CMV). Véase, por ejemplo, Patente de los EE.UU. Nº 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de metalotioneína (Patente de los EE.UU. Nº 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Se usa generalmente selección de fármacos para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Se hace referencia comúnmente a tales células como "transfectantes". Se hace referencia a células que se han cultivado en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie como "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similares. Pueden

usarse también sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento al que se hace referencia como "multiplicación". La multiplicación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y aumentando después la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable multiplicable preferido es dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. Pueden usarse también otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, multi-resistencia a fármacos, puromicina acetiltransferasa). Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tales como proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC Clase I, fosfatasa alcalina de placenta, para separar células transfectadas de células no transfectadas por medios tales como separación FACS, citometría de flujo o tecnología de separación de perlas magnéticas.

Pueden usarse también como hospedantes otras células eucariotas superiores, incluyendo células de plantas, células de insectos y células de aves. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar genes en células de plantas se ha examinado por Sinkar *et al., J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47-58 (1987). La transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos extraños en ellas se describe por Guarino *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463. Pueden infectarse células de insectos con baculovirus recombinante, derivado comúnmente de *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). Véase King,L.A. y Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman & Hall, O'Reilly, D.R. *et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y Richardson, C.D., red., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. Un segundo método para producir baculovirus de zalfa11 recombinante utiliza un sistema basado en transposón descrito por Luckow (Luckow, V.A. *et al., J Virol* 67: 4566-79, 1993). Este sistema, que utiliza vectores de transferencia, se vende en el juego Bac-to-Bac® (Life Technologies, Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1® (Life Technologies) que contiene un transposón Tn7 para mover el ADN que codifica el polipéptido de zalfa11 a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado un "bácmido". Véase Hill-Perkins, M.S. y Possee, R.D., *J Gen Virol* 71: 971-6, 1990; Bonning, B.C. *et al., J Gen Virol* 75: 1551-6, 1994; y Chazenbalk, G.D. y Rapoport, B., *J Biol Chem* 270: 1543-9, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión enmarcada con ADN que codifica una etiqueta epítope en los términos C o N del polipéptido de zalfa11 expresado, por ejemplo, una etiqueta epítope Glu-Glu (Grussenmeyer, T. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci*. 82: 7952-4, 1985). Usando un método conocido en la técnica, se transforma en *E. coli* un vector de transferencia que contiene zalfa11, y se examinan bácmidos que contengan un gen de lacZ interrumpido, indicativo de baculovirus recombinante. Se aisla el ADN del bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante, usando técnicas comunes, y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. Se produce a continuación virus recombinante que expresa zalfa11. Se producen cepas víricas recombinantes por métodos usados comúnmente en la técnica.

El virus recombinante se usa para infectar células hospedantes, típicamente un linaje celular derivado de la oruga militar tardía, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Otrolinaje celular adecuado es el High FiveO® (Invitrogen) derivado de *Trichoplusia ni* (Patente de los EE.UU. Nº 5.300.435). Se usa medio exento de suero disponible comercialmente para hacer crecer y mantener las células. Son medios adecuados Sf900 II® (Life Technologies) o ESF 921® (Expression Systems) para las células Sf9; y Ex-cellO405® (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO® (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Los procedimientos usados se describen generalmente en manuales de laboratorio disponibles (King,L.A. y Possee, R.D., *ibid*.; O'Reilly, D.R. *et al*., *ibid*.; Richardson, C.D., *ibid*.). La purificación subsiguiente del polipéptido de zalfa11 del sobrenadante puede conseguirse usando métodos descritos aquí.

También pueden usarse células de hongos, incluyendo células de levadura, dentro de la presente invención. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Se describen métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir a partir de ellas polipéptidos recombinantes, por ejemplo, por Kawasaki, Patente de los EE.UU. Nº 4.599.311; Kawasaki *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.931.373; Brake, Patente de los EE.UU. Nº 4.870.008; Welch *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.037.743; y Murray *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.845.075. Se seleccionan células transformadas por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a fármacos o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* descrito por Kawasaki *et al*. (Patente de los EE.UU. Nº 4.931.373), que permite seleccionar células transformadas por crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores preferidos de uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, Patente de los EE.UU. Nº 4.599.311; Kingsman *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.615.974; y Bitter, Patente de los EE.UU. Nº 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también Patentes de los EE.UU. Nº 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Se conocen en la técnica sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Ustilago maydis, Pichia pastoris, Pichia methanolica, Pichia guillermondii* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson *et al., J. Gen. Microbiol*. 132: 3459-3465, 1986 y Cregg, Patente de los EE.UU. Nº 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* según los métodos de McKnight *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.935.349. Se describen métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* por Sumino *et al*., Patente de os EE.UU. Nº 5.162.228. Se describen métodos para transformar *Neurospora* por Lambowitz, Patente de los EE.UU. Nº 4.486.533.

El uso de *Pichia methanolica* como hospedante para la producción de proteínas recombinantes se describe en las Publicaciones WIPO WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Se prepararán comúnmente moléculas de ADN de uso para transformar *P. methanolica* como plásmidos circulares de doble cadena que se linealizan preferiblemente antes de la transformación. Para producción de polipéptidos en *P. methanolica*, se prefiere que el promotor y el terminador en el plásmido sean el de un gen de *P. methanolica*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolica* (*AUG1 o AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del ADN en el cromosoma del hospedante, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado en ambos extremos por secuencias de ADN del hospedante. Un marcador seleccionable preferido para uso en *Pichia methanolica* es un gen *ADE2* de *Pichia methanolica*, que codifica fosforibosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite a células hospedantes *ade2* crecer en ausencia de adenina. Para procedimientos industriales a gran escala, en los que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células hospedantes en las que se suprimen ambos genes de utilización de metanol (*AUG1 y AUG2*). Para producción de proteínas segregadas, se prefieren células hospedantes defectuosas en genes de proteasa vacuolar (*PEP4 y PRB1*). Se usa electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene ADN que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolica*. Se prefiere transformar células de *P. methanolica* por electroporación usando un campo eléctrico pulsado que decrece exponencialmente, que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kv/cm, preferiblemente alrededor de 3,75 kv/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, más preferiblemente alrededor de 20 milisegundos.

Son también células hospedantes útiles dentro de la presente invención células hospedantes procariotas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli, Bacillus* y otros géneros. Los métodos para transformar estos hospedantes y expresar secuencias de ADN extraño clonadas en ellas son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al., ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido de zalfa11 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede conservarse en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles, o puede dirigirse al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, y los gránulos se recuperan y desnaturalizan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado puede replegarse y dimerizarse después diluyendo el desnaturalizante, tal como mediante diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutationa reducida y oxidada, seguido por diálisis frente a una solución salina tamponada. En este último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional rompiendo las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando por ello la necesidad de desnaturalización y repliegue.

Las células hospedantes transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células hospedantes escogidas. Se conoce en la técnica una variedad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, e incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden contener también componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento seleccionará generalmente células que contengan el ADN añadido exógenamente mediante, por ejemplo, selección con fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable llevado en el vector de expresión o co-transfectado en la célula hospedante. Se cultivan células de *P. methanolica* en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y nutrientes en trazas a una temperatura de aproximadamente 25ºC a 35ºC. Se proporcionan cultivos líquidos con aireación suficiente por medios convencionales, tales como sacudida de matraces pequeños o burbujeo de fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD (2% de D-glucosa, 2% de Bacto® Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1% de extracto de levadura Bacto® (Difco Laboratories), 0,004% de adenina y 0,006% de L-leucina).

Las células de mamífero de uso adecuado para ensayar actividad antagonista de los nuevos receptores solubles de la presente invención expresan un receptor zalfa11 o fusión de receptor capaz de señalar y transducir una señal mediada por receptor del Ligando de zalfa11. Tales células incluyen células que expresan una subunidad β, tales como gp130, IL-2Rγ y células que co-expresan receptores (Gearing *et al., EMBO J.* 10: 2839-2848, 1991); Gearing *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.284.755). A este respecto se prefiere generalmente emplear una célula que responda a otras citoquinas que se unen a receptores de las misma subfamilia, tales como IL-6 o LIF, porque tales células contienen la(s) trayectoria(s) de transducción de señal requerida(s). Las células de este tipo preferidas incluyen el linaje celular TF-1 humano (número ATCC CRL-2003) y el linaje celular DA-1 (Branch *et al., Blood* 69: 1782, 1987; Broudy *et al., Blood* 75: 1622-1626, 1990). Como alternativa, pueden diseñarse células hospedantes adecuadas para producir una subunidad β u otro componente celular necesario para la respuesta celular deseada. Por ejemplo, se ha usado el linaje celular de ratón BaF3 (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Provot *et al., Mol. Cell. Biol*. 6: 4133-4135, 1986) para producir un linaje celular que responda al Ligando de zalfa11 (véanse Ejemplos). Otros linajes tales incluyen un linaje celular de riñón de hámster pequeño (BHK), o el linaje celular CTLL-2 (ATCC TIB-214) puede transfectarse para expresar una subunidad de IL-2Rγ además de receptor zalfa11. Se prefiere generalmente usar una célula hospedante y receptor(es) de la misma especie, aunque este método permite diseñar linajes celulares para expresar subunidades múltiples de receptor de cualquier especie, superando por ello limitaciones potenciales procedentes de la especificidad de la especie. Como alternativa, pueden clonarse homólogos de especies del cADN de receptor humano y usarse dentro de linajes celulares de las mismas especies, tales como un cADN de ratón en el linaje celular BaF3. Pueden diseñarse así linajes celulares que son dependientes de un factor de crecimiento hematopoyético, tal como IL-3, para resultar dependientes del ligando de zalfa11. Tales células pueden usarse como se describe aquí en presencia de Ligando de zalfa11 para valorar la actividad antagonista de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble en la actividad de señalización y proliferativa de Ligando de zalfa11.

Se usan dentro de ensayos de examen células que expresan receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Se conoce en la técnica una variedad de ensayos adecuados. Estos ensayos se basan en la detección de una respuesta biológica en la célula objetivo al Ligando de zalfa11 en presencia o ausencia de los receptores solubles de la presente invención. Un ensayo así es un ensayo de proliferación celular. Se cultivan células en presencia o ausencia de Ligando de zalfa11 con o sin adición de otras citoquinas o agentes proliferativos y se detecta proliferación celular, por ejemplo, midiendo la incorporación de timidina tritiada o por ensayo colorimétrico basado en la descomposición metabólica de Alamar Blue® (AccuMed, Chicago, IL) o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mosman, *J. Immunol. Meth*. 65: 55-63, 1983). Un formato de ensayo alternativo usa células que se diseñan adicionalmente para expresar un gen informador. El gen informador está enlazado a un elemento promotor que responde a la trayectoria enlazada al receptor, y el ensayo detecta la activación de la transcripción del gen informador. Los elementos de respuesta del ADN pueden incluir, aunque sin limitarse a ellos, Elementos de respuesta a AMP cíclicos (CRE), elementos de respuesta a hormonas (HRE), elemento de respuesta a insulina (IRE) (Nasrin *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5273-7, 1990) y elementos de respuesta a suero (SRE) (Shaw *et al., Cell* 56: 563-72, 1989). Los elementos de respuesta a AMP cíclicos se examinan en Roestler *et al., J. Biol. Chem*. 263 (19): 9063-6; 1998 y Habener, *Molec. Endocrinol*. 4 (8): 1087-94, 1990. Se examinan elementos de respuesta a hormonas en Beato, *Cell* 56: 335-44; 1989. Un elemento promotor preferido a este respecto es un elemento de respuesta a suero o SRE (véase, por ejemplo, Shaw *et al., Cell* 56: 563-572, 1989). Un gel informador tal preferido es un gen de luciferasa (de Wet *et al., Mol. Cell. Biol*. 7: 725, 1987). La expresión del gen de luciferasa se detecta por luminiscencia usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Baumgartner *et al., J. Biol. Chem*. 269: 19094-29101, 1994; Schenborn y Goiffin, *Promega Notes* 41: 11, 1993). Están disponibles comercialmente juegos de ensayo de luciferasa de, por ejemplo, Promega Corp., Madison, WI. Pueden usarse linajes celulares objetivo de este tipo para examinar genotecas de productos químicos, medios de cultivo acondicionados para células, caldos de hongos, muestras de tierra, muestras de agua y similares para actividad antagonista. Tales células pueden usarse como se describe aquí en presencia de Ligando de zalfa11 en un ensayo de tipo inhibición competitiva para valorar la actividad antagonista de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble en actividad de señalización y proliferativa de Ligando de zalfa11.

Pueden usarse también métodos de ensayo de proliferación de células T y B para valorar la actividad antagonista de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble en actividad de señalización y proliferativa de Ligando de zalfa11 en presencia de otras citoquinas, por ejemplo, IL-15, Flt3 y similares. Tales ensayos se describen aquí en los ejemplos, y son conocidos en la técnica. Brevemente, usando citometría de flujo, se aislan subgrupos de células T o células B maduros o inmaduros en base a la presencia o ausencia de diversas moléculas de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD8, CD19, CD3, CD40, CD28, etc.). Pueden seleccionarse células antes o después de exposición a Ligando de zalfa11, dependiendo del tipo de célula estudiado y del efecto sobre ellas de Ligando de zalfa11. Los receptores solubles o anticuerpos de la presente invención pueden añadirse en un intervalo de concentraciones para valorar la actividad antagonista o de unión sobre el Ligando en el ensayo de proliferación de células T o células B. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica y se describen aquí.

Además, puede usarse un método de trampa de secreción que emplea receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles para aislar células transfectadas que expresan Ligando de zalfa11. Véase para el método Aldrich *et al., Cell* 87: 1161-1169, 1996. Una genoteca de expresión de cADN preparada a partir de una fuente de ligando conocida o sospechada se transfecta en células COS-7. El vector de genoteca de cADN tiene generalmente un origen de SV40 para multiplicar en células COS-7 y un promotor de CMV para alta expresión. Las células COS-7 transfectadas se hacen crecer en una monocapa y se fijan y permeabilizan después. El receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles etiquetados o marcados con biotina, descritos aquí, se ponen después en contacto con la capa de células y se permiten unirse a células de la monocapa que expresan una anti-molécula complementaria, es decir, un Ligando de zalfa11. Una célula que expresa un ligando se unirá así con moléculas de receptor. Se usa un anticuerpo anti-etiqueta (anti-Ig para fusiones de Ig, M2 o anti-FLAG para fusiones etiquetadas con FLAG, estreptavidina y similares) que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para visualizar estas células a las que se ha unido el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles etiquetados o marcados con biotina. La HRP cataliza la deposición de un reactivo de tiramida, por ejemplo, tiramida-FITC. Puede usarse para esta detección un juego disponible comercialmente (por ejemplo, Renaissance TSA-Direct® Kit; NEN Life Science Products, Boston, MA). Se identificarán células que expresan Ligando de receptor zalfa11 bajo microscopía de fluorescencia como células verdes, y se recogerán para clonación subsiguiente del ligando usando procedimientos para rescate de plásmidos como se indica en Aldrich *et al., supra*, seguida por rondas subsiguientes del ensayo de trampa de secreción hasta identificar clones simples.

Además, pueden usarse métodos histológicos e inmunohistoquímicos que emplean receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles para identificar células y células de tejidos que expresan Ligando de zalfa11. Tales métodos son conocidos en la técnica y se describen aquí.

Los ensayos adicionales para detectar la actividad antagonista o de unión de receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles proporcionados por la presente invención incluyen el uso de polipéptidos de receptor híbridos. Estos polipéptidos híbridos pertenecen a dos clases generales. Dentro de la primera clase, el dominio intracelular de zalfa11, que comprende aproximadamente los residuos 256 (Lys) a 528 (Ser) de SEQ ID NO: 2, está unido al dominio de unión a ligando de un segundo receptor. Se prefiere que el segundo receptor sea un receptor de citoquina hematopoyético, tal como un receptor mpl (Souyri *et al., Cell* 63: 1137-1147, 1990). El receptor híbrido comprenderá además un dominio transmembrana, que puede derivarse de cualquier receptor. Una construc-

ción de ADN que codifica el receptor híbrido se inserta después en una célula hospedante. Se cultivan después células que expresan el receptor híbrido en presencia de un ligando para el dominio de unión y se ensaya una respuesta. Este sistema proporciona un medio para analizar transducción de señal mediada por zalfa11 mientras se utilizan ligandos disponibles fácilmente. Este sistema también puede usarse para determinar si linajes celulares particulares son capaces de responder a señales transducidas por zalfa11. Una segunda clase de polipéptidos de receptor híbrido comprende el dominio extracelular (unión a ligando) de zalfa11 (aproximadamente los residuos 20 (Cys) a 237 (His) de SEQ ID NO: 2) con un dominio citoplásmico de un segundo receptor, preferiblemente un receptor de citoquina, y un dominio transmembrana. El dominio transmembrana puede derivarse de cualquier receptor. Tales receptores híbridos se expresan en células de las que se sabe que son capaces de responder a señales transducidas por el receptor que comprende el dominio extracelular, tal como en presencia del Ligando de zalfa11. Se usa la adición del receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles, en presencia del Ligando de zalfa11, para valorar la actividad antagonista o de unión de Ligando de zalfa11 del receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles para el Ligando de zalfa11.

La especificidad de tejidos y las actividades biológicas de la expresión de Ligando de zalfa11 sugieren un papel en el desarrollo temprano de células NK y timocitos, expansión de células B maduras, estimulación de la respuesta inmune general y regulación de la respuesta inmune. Estos procesos implican estimulación de proliferación y diferenciación de células en respuesta a la unión del Ligando de zalfa11 a su receptor cognado, que comprende al menos una subunidad de receptor zalfa11. A la vista de la actividad biológica observada para este Ligando, los antagonistas tienen un potencial enorme en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Como antagonistas del Ligando de zalfa11, el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles pueden encontrar utilidad en la supresión del sistema inmune, tal como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn y similares. La supresión inmune puede usarse también para reducir el rechazo de trasplantes e injertos de tejidos u órganos y para tratar malignidades de células B, leucemias o linfomas específicos de células T, inhibiendo la proliferación del tipo de células afectado.

El receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles pueden usarse también dentro de sistemas de diagnóstico para la detección de niveles en circulación de Ligando de zalfa11. Dentro de una realización relacionada, pueden usarse anticuerpos u otros agentes que se unen específicamente a receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero de zalfa11 solubles para detectar polipéptidos del receptor en circulación. Niveles elevados o rebajados de Ligando o polipéptidos de receptor pueden ser indicativos de estados patológicos, incluyendo cáncer. Los polipéptidos de receptor solubles pueden contribuir a procesos patológicos y pueden ser un marcador indirecto de una enfermedad subyacente. Por ejemplo, se han asociado niveles elevados de receptor de IL-2 soluble en suero humano con una amplia variedad de estados inflamatorios y neoplásticos, tales como infarto de miocardio, asma, miastenia grave, artritis reumatoide, leucemia de células T aguda, linfomas de células B, leucemia linfocítica crónica, cáncer de colon, cáncer de pecho y cáncer de ovarios (Heaney *et al., Blood* 87: 847-857, 1996).

Puede prepararse un polipéptido de unión a ligando de un receptor zalfa11, tal como receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, expresando un ADN truncado que codifica el dominio de unión a citoquina de zalfa11 (aproximadamente del residuo 20 (Cys) al residuo 237 (His) del receptor humano (SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 6) o la región correspondiente de un receptor no humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 12). Un polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, puede prepararse co-expresando un ADN truncado que codifica el dominio de unión a citoquina de zalfa11 (SEQ ID NO: 6) y el ADN truncado que codifica el dominio extracelular de otro receptor de citoquina clase I, tal como IL-2Rγ (SEQ ID NO: 4). Se prefiere preparar los dominios extracelulares del homodímero o heterodímero de zalfa11 solubles en una forma esencialmente exenta de segmentos de polipéptido transmembrana e intracelular. Además, los fragmentos de polipéptido de unión a ligando dentro del receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble (por ejemplo, zalfa11/IL-2Rγ soluble), o dominio de unión a citoquina, descritos antes, pueden servir también como receptores solubles zalfa11 para los usos descritos aquí. Para dirigir la exportación de un polipéptido de receptor desde la célula hospedante, el ADN del receptor se enlaza a un segundo segmento de ADN que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor de t-PA, un péptido secretor de otro receptor de citoquina, otra molécula segregada o un péptido secretor de receptor zalfa11. Para facilitar la purificación del polipéptido de receptor segregado, puede fusionarse al polipéptido de receptor soluble una extensión C-terminal, tal como una etiqueta de poli-histidina, sustancia P, péptido de Flag® (Hopp *et al., Bio/Technology* 6: 1204-1210, 1988; disponible de Eastman Kodak Co., New Haven, CT), una etiqueta Glu-glu (SEQ ID NO: 14) u otro polipéptido o proteína para los que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específico.

En un método alternativo, puede expresarse un dominio extracelular del receptor como una fusión con regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina, típicamente un fragmento F_c, que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable. Tales fusiones son segregadas típicamente como moléculas multímeras en las que las porciones F_c están unidas entre sí por disulfuro y dos polipéptidos del receptor están colocados en estrecha proximidad entre sí. Pueden usarse fusiones de este tipo para purificar por afinidad el ligando cognato de la solución, como una herramienta de ensayo *in vitro*, para bloquear señales *in vitro* titulando específicamente Ligando, y como antagonistas *in vivo* administrándolos parenteralmente para unirse a ligando en circulación y separarlos da la circulación. Para purificar el ligando, se añade una quimera zalfa11-Ig (por ejemplo, Zalfa11-Fc4 descrito aquí) a una muestra que contiene el ligando (por ejemplo, medios de cultivo o extractos de tejidos con células acondicionadas) en condiciones que facilitan la unión receptor-ligando (típicamente, temperatura, pH y fuerza iónica casi fisiológicas). El complejo

quimera-ligando se separa después por la mezcla usando proteína A, inmovilizada en un soporte sólido (por ejemplo, perlas de resina insoluble). Se eluye después el ligando usando técnicas químicas convencionales, tales como con una sal o gradiente de pH. Como alternativa, la propia quimera puede unirse a un soporte sólido, realizando la unión y elución como antes. Las fracciones recogidas pueden refraccionarse hasta alcanzar el nivel de pureza deseado.

Además, el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse como "sumidero de ligando", es decir, antagonista, para unirse a ligando *in vivo* o *in vitro* en aplicaciones terapéuticas u otras en las que no se desee la presencia del ligando. Por ejemplo, en cánceres que expresan grandes cantidades de Ligando de zalfa11 bioactivo, pueden usarse receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, como antagonista directo del ligando *in vivo*, y pueden ayudar a reducir la progresión y los síntomas asociados con la enfermedad, y pueden usarse conjuntamente con otras terapias (por ejemplo, quimioterapia) para aumentar el efecto de la terapia en la reducción de la progresión y los síntomas, e impedir la recaída. Además, el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse para disminuir la progresión de cánceres que sobreexpresan receptores zalfa11, uniéndose a ligando *in vivo* que de otro modo aumentaría la proliferación de esos cánceres.

Además, el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse *in vivo* o en aplicaciones de diagnóstico para detectar cánceres que expresan Ligando de zalfa11 *in vivo* o en muestras de tejidos. Por ejemplo, el receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden conjugarse a una radiomarca o marca fluorescente como se describe aquí, y usarse para detectar la presencia del Ligando de zalfa11 en una muestra de tejido usando un ensayo de unión de tipo ligando-receptor *in vitro*, o un ensayo de formación de imagen fluorescente. Además, un receptor zalfa11 soluble o los polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, radiomarcados podrían administrarse *in vivo* para detectar tumores sólidos que expresan Ligando a través de un método de radio-formación de imagen conocido en la técnica.

Se prefiere purificar los polipéptidos de la presente invención hasta $\geq$ 80% de pureza, más preferiblemente $\geq$ 90% de pureza, aún más preferiblemente $\geq$ 95% de pureza, y es particularmente preferido un estado farmacéuticamente puro, que es mayor del 99% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, un polipéptido purificado está sustancialmente exento de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Pueden purificarse receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble (o polipéptidos quiméricos o de fusión de zalfa11), recombinantes expresados, usando fraccionamiento y/o métodos y medios de purificación convencionales. Pueden usarse para fraccionamiento de muestras precipitación con sulfato amónico y extracción con ácido o caotropo. Los ejemplos de etapas de purificación pueden incluir hidroxiapatita, exclusión por tamaños, FPLC y cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad y similares. Se prefieren derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los ejemplos de medios cromatográficos incluyen los medios derivados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares, que son insolubles en las condiciones en que han de usarse. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la incorporación de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidratos de carbono. Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Éstos y otros medios sólidos son muy conocidos y ampliamente usados en la técnica, y están disponibles de suministradores comerciales. Los métodos para unir polipéptidos de receptor a medios de soporte son muy conocidos en la técnica. La selección de un método particular es una materia de diseño rutinario y está determinada en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención pueden aislarse explotando sus propiedades bioquímicas, estructurales y biológicas. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción de iones de metales inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden etiquetas de polihistidina. Brevemente, se carga primero un gel con iones de metales divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Tends in Biochem.* 3: 1-7, 1985). Se adsorberán proteínas ricas en histidina en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion de metal usado, y se eluirán por elución competitiva, disminuyendo el pH, o el uso de agentes de quelación fuertes. Otros métodos de purificación incluyen purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad de lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher (red.), Academic Press, San Diego, 1990, págs. 529-39). Dentro de realizaciones adicionales de la invención, puede construirse para facilitar la purificación una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina). Además, pueden usarse columnas de afinidad de Ligando de zalfa11 para purificar receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Tales métodos de cromatografía de afinidad son muy conocidos en la técnica.

Además, usando métodos descritos en la técnica, se construyen fusiones de polipéptidos, o proteínas de zalfa11 híbridas, usando regiones o dominios del zalfa11 de la invención en combinación con los de otras proteínas de la familia de receptores de citoquina humana, o proteínas heterólogas (Sambrook *et al., ibid*., Altschul *et al., ibid*., Picard, *Cur. Opin. Biology*, 5:511-5, 1994, y referencias en ellos). Estos métodos permiten determinar la importancia biológica de dominios o regiones mayores en un polipéptido de interés. Tales híbridos pueden alterar la cinética de reacción, unir, estrechar o expandir la especificidad del sustrato, o alterar la localización en tejidos y celular de un polipéptido, y puede aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Pueden prepararse polipéptidos o proteínas de fusión de receptores solubles por métodos conocidos por los expertos en la técnica preparando cada componente de la proteína de fusión y conjugándolos químicamente. Alternativamente, puede generarse un polinucleótido que codifica uno o más componentes de la proteína de fusión en el marco de lectura apropiado usando técnicas conocidas, y expresarse por los métodos descritos aquí. Por ejemplo, parte o la totalidad de un(os) dominio(s) que confiere(n) una función biológica pueden intercambiarse entre zalfa11 de la presente invención con el(los) dominio(s) equivalente(s) funcionalmente de otro miembro de la familia de citoquinas. Tales dominios incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el dominio de unión de citoquina extracelular, dominio de unión de ligando y residuos, dominio transmembrana, como se describe aquí. Sería de esperar que tales proteínas de fusión tengan un perfil funcional biológico que sea igual o similar a polipéptidos de la presente invención u otras proteínas de la familia conocidas, dependiendo de la fusión construida. Además, tales proteínas de fusión pueden presentar otras propiedades como se describe aquí.

Pueden usarse técnicas biológicas y de clonación moleculares estándares para intercambiar los dominios equivalentes entre el polipéptido de zalfa11 y los polipéptidos a los que se fusionan. En general, un segmento de ADN que codifica un dominio de interés, por ejemplo, un dominio de zalfa11 descrito aquí, se enlaza operativamente enmarcado con al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido adicional (por ejemplo, un dominio o región de otro receptor de citoquina, tal como el receptor IL-2Rγ) y se inserta en un vector de expresión apropiado, como se describe aquí. Generalmente, se hacen construcciones de ADN de tal modo que los varios segmentos de ADN que codifican las regiones correspondientes de un polipéptido están enlazados operativamente enmarcados para hacer una construcción simple que codifica la proteína de fusión completa, o una porción funcional de ella. Por ejemplo, una construcción de ADN codificaría desde el término N al término C una proteína de fusión que comprendería un polipéptido de señal seguido por un dominio de unión a citoquina. Tales proteínas de fusión pueden expresarse, aislarse y ensayar su actividad como se describe aquí.

Pueden prepararse también mediante síntesis química receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ, o fragmentos de ellos. Tales polipéptidos pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o no incluir un residuo de aminoácido metionina inicial.

Los polipéptidos de la presente invención pueden sintetizarse también por síntesis en fase sólida exclusiva, métodos en fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis en solución clásica. Los métodos para sintetizar polipéptidos son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc*. 85: 2149, 1963; y Kaiser *et al., Anal. Biochem*. 34: 595, 1970. Después de la síntesis completa del péptido deseado en un soporte sólido, el péptido-resina está con un reactivo que divide el polipéptido de la resina y separa buena parte de los grupos protectores de cadenas secundarias. . Tales métodos están bien establecidos en la técnica.

La actividad de moléculas de la presente invención puede medirse usando una variedad de ensayos que miden la diferenciación y proliferación celular. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica y se describen aquí.

Las proteínas de la presente invención son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos linfoides, inmunes, hematopoyéticos, inflamatorios y similares, y puede medirse *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* administrando moléculas de la invención reivindicada al modelo de animal apropiado. Por ejemplo, pueden embeberse células hospedantes que expresan un receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, en un ambiente de alginato e inyectarse (implantarse) en animales receptores. La microencapsulación en alginato-poli-L-lisina, la encapsulación en membrana permsolectiva y cámaras de difusión son un medio para atrapar células de mamífero transfectadas o células de mamífero primarias. Estos tipos de "encapsulaciones" no inmunógenas permiten la difusión de proteínas y otras macromoléculas segregadas o liberadas por las células capturadas al animal receptor. De manera más importante, las cápsulas ocultan y protegen las células extrañas embebidas de la respuesta inmune del animal receptor. Tales encapsulaciones pueden extender la vida de las células inyectadas desde unas pocas horas o días (células desnudas) a varias semanas (células embebidas). Las fibras de alginato proporcionan un medio simple y rápido para generar células embebidas.

Los materiales necesarios para generar las fibras de alginato son conocidos en la técnica. En un ejemplo de procedimiento, se prepara 3% de alginato H_2O agua estéril, y se filtra estérilmente. Inmediatamente antes de preparar las fibras de alginato, la solución de alginato se filtra de nuevo. Una suspensión de células de aproximadamente el 50% (que contiene alrededor de 5 x 10^5 a aproximadamente 5 x 10^7 células/ml) se mezcla con solución de alginato del 3%. Un ml de la suspensión de alginato/células se extruye en una solución de $CaCl_2$ filtrada estéril 100 mM durante un período de tiempo de ~15 min, formando una "fibra". La fibra extruída se transfiere después a una solución de $CaCl_2$ 50 mM y después a una solución de $CaCl_2$ 25 mM. Se enjuaga después al fibra con agua desionizada antes de revestir la fibra incubando en una solución del 0,01% de poli-L-lisina. Finalmente, se enjuaga la fibra con Solución de Ringer

Lactada y se retira de la solución en un cilindro de jeringa (sin aguja). Se incorpora después a la jeringa una aguja de calibre grande, y la fibra se inyecta intraperitonealmente en un receptor en un volumen mínimo de la Solución de Ringer Lactada.

Pueden usarse sistemas adenovíricos y otros víricos, tales como virus de vacunas, para expresar y producir las proteínas de la presente invención. Por ejemplo, usando vectores de adenovirus en los que se ha suprimido porciones del genoma del adenovirus, se incorporan insertos en el ADN vírico por ligación directa o por recombinación homóloga con un plásmido co-transfectado. En un ejemplo de sistema, se ha suprimido del vector vírico el gen E1 esencial, y el virus no se replicará salvo que se proporcione el gen E1 por la célula hospedante (el linaje celular 293 humano es un ejemplo). Si el sistema de entrega adenovírico tiene una supresión de gen E1, el virus no puede replicarse en células humanas, pero expresará y procesará (y, si está presente una secuencia de señal secretora, segregará) la proteína heteróloga. Además, suprimiendo el genoma de adenovirus completo, pueden acomodarse insertos muy grandes de ADN heterólogo. La generación de adenovirus denominados "sin contenido" en los que todos los genes víricos están suprimidos es particularmente ventajosa para inserción de grandes insertos de ADN heterólogo. Para tener un examen, véase Yeh, P. y Perricaudet, M., *FASEB J*. 11: 615-623, 1997.

El sistema de adenovirus puede usarse para producción de proteínas *in vitro*. Cultivando células no 293 infectadas con adenovirus en condiciones en las que las células no se dividen rápidamente, las células pueden producir proteínas durante extensos períodos de tiempo. Por ejemplo, se hacen crecer células BHK hasta confluencia en fábricas de células, y se exponen al vector adenovírico que codifica la proteína segregada de interés. Se hacen crecer después las células en condiciones exentas de suero, lo que permite sobrevivir a las células infectadas durante varias semanas sin división celular significativa. Alternativamente, pueden hacerse crecer como células adherentes células 293 infectadas con vector de adenovirus o en cultivo en suspensión con una densidad de células relativamente alta para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier *et al., Cytotechnol*. 15: 145-55, 1994). Con cualquier método, una proteína heteróloga expresada y segregada puede aislarse repetidamente del sobrenadante del cultivo, lisado o fracciones de membrana de células dependiendo de la disposición de la proteína expresada en la célula. Dentro del método de producción de células 293 infectadas, pueden obtenerse eficazmente también proteínas no segregadas.

Pueden usarse *in vitro* antagonistas de receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble, en un ensayo para medir una disminución en el estímulo de formación de colonias por Ligando de zalfa11 a partir de cultivos de médula ósea primaria aislada. Tales ensayos se describen aquí y son muy conocidos en la técnica.

Los antagonistas y agentes de unión de Ligando de zalfa11 también son útiles como reactivos de investigación para caracterizar lugares de interacción ligando-receptor. Los inhibidores de la actividad de Ligando de zalfa11 (antagonistas de Ligando de zalfa11) incluyen anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como anticuerpos anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble y receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles, así como otros agentes peptídicos y no peptídicos (incluyendo ribozimas).

Puede usarse también un polipéptido de unión a ligando de receptor zalfa11 soluble o polipéptidos de receptor heterodímero zalfa11 soluble, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble de la presente invención, para purificar Ligando de zalfa11. El polipéptido se inmoviliza en un soporte sólido, tal como perlas de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliacrilamida reticulada o materiales similares que sean estables en las condiciones de uso. Los métodos para enlazar polipéptidos a soportes sólidos son conocidos en la técnica, e incluyen química de aminas, activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo y activación con hidrazida. El medio resultante se configurará generalmente en forma de una columna, y se hacen pasar fluidos que contienen ligando a través de la columna una o más veces para permitir al ligando unirse al polipéptido receptor. El ligando se eluye después usando cambios de concentración de sal, agentes caotrópicos (HCl de guanidina) o pH para romper la unión ligando-receptor.

Puede emplearse ventajosamente un sistema de ensayo que usa un receptor de unión a ligando (o un anticuerpo, un miembro de un par complemento/anti-complemento) o un fragmento de unión de ellos, y un instrumento biosensor disponible comercialmente (por ejemplo, BIAcore®, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ; o tecnología SELDI®, Ciphergen, Inc. Palo Alto, CA). Tal receptor, anticuerpo, miembro de un par complemento/anti-complemento o fragmento se inmoviliza en la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento se describe por Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145: 229-240, 1991 y Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol*. 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento se incorpora covalentemente, usando química de amina o sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están incorporadas a película de oro dentro de la célula que fluye. Se hace pasar una muestra de ensayo a través de la célula. Si un ligando, epítope o miembro opuesto del par complemento/anti-complemento está presente en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, causando un cambio del índice de refracción del medio, lo que se detecta como un cambio de la resonancia del plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de proporciones dentro y fuera, de las que puede calcularse la afinidad de unión, y valorar la estequiometría de unión.

Los polipéptidos de receptor de unión a ligando, tales como los de la presente invención, pueden usarse también dentro de otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Tales sistemas incluyen análisis de Scatchard para determi-

nar afinidad de unión (véase Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci*. 51: 660-672, 1949) y ensayos calorimétricos Cunningham *et al., Science* 253, 545-48, 1991; Cunningham *et al., Science* 245, 821-25, 1991).

Pueden usarse también receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles, para preparar anticuerpos que se unen a epítopes, péptidos o polipéptidos contenidos dentro del antígeno. El receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles o un fragmento de ellos sirve como antígeno (inmunógeno) para inocular a un animal y obtener una respuesta inmune. Un experto en la técnica reconocería que polipéptidos antígenos que llevan epítope contienen una secuencia de al menos 6, preferiblemente al menos 9, y más preferiblemente al menos 15 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos contiguos de un receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 4). Se incluyen polipéptidos que comprenden una porción mayor de un receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles, es decir, de 30 a 100 residuos hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos. Antígenos o epítopes inmunógenos pueden incluir también etiquetas, coadyuvantes y vehículos incorporados, como se describe aquí. Los antígenos adecuados incluyen el polipéptido de zalfa11 codificado por SEQ ID NO: 2 desde el aminoácido número 20 (Cys) al aminoácido número 237 (His) (SEQ ID NO: 6), o un fragmento del mismo de aminoácidos 9 a 218 AA contiguo. Los péptidos preferidos para usar como antígeno son el dominio de unión a citoquina, descrito aquí, y péptidos hidrófilos de zalfa11 tales como los predichos por un experto en la técnica desde un gráfico de hidrofobicidad, determinado por ejemplo a partir de un perfil de hidrofilicidad de Hopp/Woods basado en una ventana deslizante de seis residuos, ignorándose residuos G, S y T enmascarados y residuos H, Y y W expuestos. Por ejemplo, los péptidos hidrófilos de zalfa11 incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo constituido por: (1) del aminoácido número 51 (Trp) al aminoácido número 61 (Glu) de SEQ ID NO: 2; (2) del aminoácido número 136 (Ile) al aminoácido número 143 (Glu) de SEQ ID NO: 2; (3) del aminoácido número 187 (Pro) al aminoácido número 195 (Ser) de SEQ ID NO: 2; y (4) del aminoácido número 223 (Phe) al aminoácido número 232 (Glu) de SEQ ID NO: 2. Las regiones hidrófilas correspondientes con referencia a SEQ ID NO: 6 pueden hacerse con remisión a los anteriores residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Además, son antígenos adecuados polipéptidos antígenos que llevan epítope como se predice por un gráfico de Jameson-Wolf, por ejemplo, usando un programa DNASTAR Protean (DNASTAR, Inc., Madisol, WI). Además, son antígenos adecuados motivos conservados, y regiones variables entre motivos conservados de receptor soluble zalfa11. Los antígenos adecuados incluyen también los polipéptidos de zalfa11 descritos antes en combinación con otro dominio extracelular de citoquina clase I, tal como los que forman polipéptidos heterodímeros de zalfa11 solubles, tales como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Además, pueden usarse regiones correspondientes del polipéptido de receptor zalfa11 soluble de ratón (residuos 20 (Cys) a 237 (His) SEQ ID NO: 12) para generar anticuerpos contra el receptor zalfa11 de ratón soluble. Además, pueden aislarse y purificarse como se describe aquí anticuerpos generados a partir de esta respuesta inmune. Son muy conocidos en la técnica métodos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, Cooligan *et al*. (reds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición*, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J.G.R., Red., *Monoclonal Hybridoma Antibodies; Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

Como sería evidente para un experto ordinario en la técnica, pueden generarse anticuerpos policlonales incoculando una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como un polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble o un fragmento de ellos. La inmunogenicidad de un polipéptido de zalfa11 puede aumentarse mediante el uso de un coadyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o coadyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización incluyen también polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zalfa11 o una porción del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El polipéptido inmunógeno puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción del polipéptido es "tipo hapteno", tal porción puede unirse o enlazarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (tal como hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero de bovino (BSA) o toxoide de tétano) para inmunización.

Según se usa aquí, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ y Fab. También están incluidos anticuerpos intactos o fragmentos diseñados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos de Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos. Pueden humanizarse anticuerpos no humanos injertando CDRs no humanos en marcos y regiones constantes humanos, o incorporando los dominios variables no humanos completos (opcionalmente "cubriéndolos" con una superficie de tipo humano por sustitución de los residuos expuestos, en el que el resultado es un anticuerpo "chapado"). En algunos casos, anticuerpos humanizados pueden conservar residuos no humanos dentro de los dominios del marco de región variable humanos para aumentar características de unión apropiadas. Mediante humanización de anticuerpos, puede aumentarse la vida media biológica, y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas por administración a seres humanos.

Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si: 1) presentan un nivel umbral de actividad de unión y 2) no reaccionan cruzadamente de manera significativa con moléculas de polipéptido relacionadas. Un nivel umbral de unión se determina si anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble, se unen aquí a un receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11

soluble, tal como polipéptido, péptido o epítope de zalfa11/IL-2Rγ soluble con una afinidad al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión a polipéptido testigo (no receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble). Se prefiere que los anticuerpos presenten una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o superior, preferiblemente 10^7 M^{-1} o mayor, más preferiblemente 10^8 M^{-1} o superior, y aún más preferiblemente 10^9 M^{-1} o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse fácilmente por un experto ordinario en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., *Ann. NY Acad. Sci*. 51: 660-672, 1949).

Si los anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble no reaccionan cruzadamente de manera significativa con moléculas de polipéptido relacionadas se muestra, por ejemplo, por el anticuerpo que detecta receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble, pero no polipéptidos relacionados conocidos usando un análisis de manchas de Western estándar (Ausubel *et al., ibid*.). Son ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos los descritos en la técnica anterior, tales como ortólogos y parálogos conocidos, y miembros conocidos similares de una familia de proteínas. El examen puede hacerse también usando receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, no humanos, y polipéptidos mutantes de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Además, pueden examinarse anticuerpos "contra" polipéptidos relacionados conocidos, para aislar una población que se une específicamente al receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles. Por ejemplo, se adsorben anticuerpos producidos para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, en polipéptidos relacionados adheridos a una matriz insoluble; anticuerpos específicos para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, fluirán a través de la matriz en las condiciones de tampón apropiado. El examen permite el aislamiento de anticuerpos policlonales y monoclonales que no reaccionan cruzadamente con polipéptidos estrechamente relacionados conocidos (*Antibidies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (reds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; *Current Protocols in Immunology*, Cooligan *et al*. (reds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). El examen y aislamiento de anticuerpos específicos es muy conocido en la técnica. Véase *Fundamental Immunology*, Paul (reds.), Raven Press, 1993; Getzoff *et al., Adv. in Immunol*. 43: 1-98, 1988; *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Goding, J.W. (reds.), *Academic Press. Ltd*., 1996; Benjamin *et al., Ann. Rev. Immuno*l. 2: 67-101, 1984. Pueden detectarse anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tales como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble, mediante un cierto número de métodos de la técnica, y se describe después.

Puede utilizarse una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica para detectar anticuerpos que se unen a proteínas o polipéptidos de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Se describen con detalle ejemplos de ensayos en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (Reds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmuno-precipitación, ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA), ensayo de manchas puntuales o manchas de Western, ensayo de inhibición o competición y ensayo sándwich. Además, puede examinarse la unión de anticuerpos a proteína o polipéptido receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, de tipo natural frente a mutante.

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles aquí incluyen exposición *in vitro* de linfocitos a receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como proteína o péptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble, y selección de genotecas que muestran anticuerpos en fago o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, inmovilizado o marcado). Pueden obtenerse genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión potenciales para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble, examinando genotecas de péptidos aleatorios mostrados en fago (exposición de fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Pueden obtenerse de un cierto número de formas secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos, tales como mediante mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Estas genotecas de exposición de péptidos aleatorios pueden usarse para examinar péptidos que interactúan con un objetivo conocido que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. Se conocen en la técnica métodos para crear y examinar tales genotecas de exposición de péptidos aleatorios (Ladner *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.223.409; Ladner *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 4.946.778; Ladner *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.403.484 y Ladner *et al*., Patente de los EE.UU. Nº 5.571.698) y están disponibles comercialmente genotecas de exposición de péptidos aleatorios y juegos para examinar tales genotecas, por ejemplo, de Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Pueden examinarse genotecas de exposición de péptidos aleatorios usando las secuencias de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, descritas aquí para identificar proteínas que se unen a receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble. Estos "polipéptidos de unión" que interactúan con receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse para etiquetar células; para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad; pueden conjugarse directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radonúclidos y similares. Estos polipéptidos de unión pueden usarse también en métodos analíticos tales como para examinar genotecas de expresión y neutralizar actividad, por ejemplo, para bloquear la interacción entre ligando y receptor, o unión vírica a un receptor.

Los polipéptidos de unión pueden usarse también para ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles; para detectar o cuantificar receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles, como marcadores de patología o enfermedad subyacente. Estos polipéptidos de unión pueden actuar también como "antagonistas" de receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11, tal como zalfa11/IL-2Rγ, para bloquear la unión de receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11, tal como polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ, y la transducción de señal *in vitro* e *in vivo*. Nuevamente estos polipéptidos de unión anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble, serían útiles para inhibir la actividad de Ligando de zalfa11, así como la actividad del receptor o la unión de proteínas. Son realizaciones preferidas anticuerpos producidos para las combinaciones heterodímera o multímera de la presente invención, porque pueden actuar más específicamente contra el Ligando de zalfa11, o más eficazmente que los anticuerpos producidos para sólo una subunidad. Además, puede ensayarse la actividad antagonista y de unión de los anticuerpos de la presente invención en la proliferación de Ligando de zalfa11 y otros ensayos biológicos descritos aquí.

Los anticuerpos para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse para etiquetar células que expresan receptor zalfa11 o polipéptidos heterodímeros de zalfa11, tales como zalfa11/IL-2Rγ; para aislar receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptido de zalfa11/IL-2Rγ soluble mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles; para detectar o cuantificar receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, como marcador de patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos que emplean FACS; para examinar genotecas de expresión; para generar anticuerpos anti-idiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear receptor zalfa11 o polipéptido heterodímero de zalfa11, tal como zalfa11/IL-2Rγ, o la actividad de Ligando de zalfa11 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anti-complemento como intermedios. Los presentes anticuerpos pueden conjugarse también directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y usarse estos conjugados para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Además, los anticuerpos para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble o fragmentos de ellos pueden usarse *in vitro* para detectar receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, desnaturalizados o no desnaturalizados, o fragmentos de ellos en ensayos, por ejemplo, Manchas de Western u otros ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos para receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, son útiles para etiquetar células que expresan los receptores correspondientes y ensayar sus niveles de expresión, para purificación por afinidad, dentro de ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de polipéptidos de receptores solubles, métodos analíticos que emplean clasificación de células activada por fluorescencia. Además, pueden usarse anticuerpos divalentes y anticuerpos anti-idiotípicos como agonistas para imitar el efecto del Ligando de zalfa11.

Los presentes anticuerpos pueden conjugarse también directa o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y usarse estos conjugados para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, anticuerpos o polipéptidos de unión que reconocen receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de zalfa11/IL-2Rγ solubles, de la presente invención pueden usarse para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula anti-complementaria correspondiente (es decir, un receptor zalfa11 o receptor heterodímero zalfa11, tal como zalfa11/IL-2Rγ). Más específicamente, anticuerpos anti-receptor zalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble; o fragmentos bioactivos o porciones de ellos, pueden acoplarse a moléculas detectables o citotóxicas y entregarse a un mamífero que tiene células, tejidos u órganos que expresan el receptor zalfa11 o receptor heterodímero zalfa11, tal como moléculas de receptor zalfa11/IL-2Rγ . Las moléculas detectables adecuadas pueden incorporarse directa o indirectamente a polipéptidos que se unen a receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble ("polipéptidos de unión", incluyendo péptidos de unión descritos antes), anticuerpos o fragmentos bioactivos o porciones de ellos. Las moléculas detectables adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden incorporarse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o de plantas (por ejemplo, toxina de la difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionúclidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90 (incorporados directamente al polipéptido o anticuerpo, o incorporados indirectamente por medio de un resto quelante, por ejemplo). Los polipéptidos o anticuerpos de unión también pueden conjugarse a fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para incorporación indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de un par complementario/anti-complementario, en el que el otro miembro está unido al polipéptido de unión o porción de anticuerpo. Para estos fines, biotina/estreptavidina es un ejemplo de par complementario/anti-complementario.

En otra realización, pueden usarse proteínas de fusión polipéptido de unión-toxina o proteínas de fusión anticuerpo-toxina para inhibición o ablación de células o tejidos objetivo (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos).

Alternativamente, si el polipéptido de unión tiene dominios funcionales múltiples (es decir, un dominio de activación o un dominio de unión a ligando, más un dominio de fijación de objetivo), puede ser adecuada una proteína de fusión que incluya sólo el dominio de fijación de objetivo para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo de célula o tejido de interés. En aquellos casos en los que la proteína de fusión que incluye sólo un dominio simple incluya una molécula complementaria, la molécula anti-complementaria puede conjugarse a una molécula detectable o citotóxica. Tales proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan así un vehículo de fijación de objetivo genérico para entrega específica a célula/tejido de conjugados genéricos de molécula anti-complementaria-detectable/citotóxica.

En otra realización, pueden usarse proteínas de fusión de polipéptido de unión de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble-citoquina o anticuerpo-citoquina para aumentar la destrucción *in vivo* de tejidos objetivo (por ejemplo, cánceres de sangre, linfoides, de colon y de médula ósea), si el anticuerpo de polipéptido de unión-citoquina o anti-receptor xzalfa11 soluble o anti-polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como anti-zalfa11/IL-2Rγ soluble, fija como objetivo la célula hiperproliferativa (véase, en general, Hornick *et al., Blood* 89: 4437-47, 1997). Las proteínas de fusión descritas permiten la fijación de objetivo de una citoquina a un lugar de acción deseado, proporcionando por ello una concentración local de citoquina elevada. Los anticuerpos anti-homodímero y heterodímero de zalfa11 fijan como objetivo una célula o tejido indeseables (es decir, un tumor o una leucemia) y la citoquina fusionada media en la lisis de células objetivo mejorada por células efectoras. Las citoquinas adecuadas para este fin incluyen interleuquina 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), por ejemplo.

Alternativamente, el polipéptido de unión de receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, o las proteínas de fusión anticuerpos descritas aquí pueden usarse para aumentar la destrucción *in vivo* de tejidos objetivo estimulando directamente una trayectoria apoptótica modulada por receptor zalfa11, produciendo la muerte celular de células hiperproliferativas que expresan receptor zalfa11 o un receptor heterodímero de zalfa11, tal como receptor zalfa11/IL-2Rγ soluble.

Las citoquinas de cuatro haces helicoidales que se unen a receptores de citoquina así como otras proteínas producidas por linfocitos activados juegan un papel biológico importante en diferenciación celular, activación, reclutamiento y homeostasis de células por todo el cuerpo. La utilidad terapéutica incluye tratamiento de enfermedades que requieren regulación inmune incluyendo enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico y diabetes. Los antagonistas de Ligando de zalfa11, incluyendo receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden ser importantes en la regulación de inflamación, y serían por tanto útiles en el tratamiento de artritis reumatoide, asma, colitis ulcerativa, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn y sepsis. Puede haber un papel de antagonistas de Ligando de zalfa11, incluyendo receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, para mediar en tumorgénesis, y serían por tanto útiles en el tratamiento de cáncer. Los antagonistas de Ligando de zalfa11, incluyendo receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden ser un potencial terapéutico para suprimir el sistema inmune que sería importante para reducir el rechazo de injertos. El receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden tener utilidad en la prevención de injerto frente a enfermedad del hospedante.

Alternativamente, los antagonistas de Ligando de zalfa11, incluyendo receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como receptores zalfa11/IL-2Rγ solubles, conjuntamente con otras citoquinas pueden permitir activación selectiva, aumento o supresión selectiva del sistema inmune conjuntamente con Ligando de zalfa11 sobre otras citoquinas que serían importantes para estimular inmunidad a enfermedades infecciosas, tratar pacientes inmunocomprometidos, tales como un paciente VIH+ o para mejorar vacunas. En particular, los antagonistas de zalfa11, incluyendo receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, podrían impedir la expansión de un subgrupo del sistema inmune que implica Ligando de zalfa11 (por ejemplo, células NK y células B maduras), mientras permitirían la expansión de progenitores inducida por otras citoquinas (por ejemplo, células T), y proporcionaría valor terapéutico en el tratamiento de infección vírica y otra infección. Por ejemplo, con infección por virus de Dengue, que causa fiebre hemorrágica por Dengue/síndrome de shock por Dengue (DHF/DSS), se cree que tiene lugar DHF/DSS grave como resultado de "aumento inmune", es decir, replicación aumentada del virus en presencia de anticuerpos preexistentes contra otro serotipo. En la segunda infección por un serotipo de virus de Dengue diferente, el sistema inmune produce anticuerpos contra el primer virus que reaccionan cruzadamente pero no neutralizan el virus, y que ayudan potencialmente en su entrada en macrófagos. Así, la supresión de la respuesta inmune del anticuerpo, o respuesta de células B, durante una segunda o tercera infección por Dengue puede ayudar al sistema inmune a reaccionar apropiadamente en la segunda infección para neutralizar el virus suprimiendo los anticuerpos "que aumentan" de la infección por el primer serotipo, y evitando en consecuencia DHF/DSS grave. Para un examen, véase White, D.O. y Fenner F.J. (Reds.) *Medical Virology*, 3ª Ed., Academic Press, Orlando Fl, 1986, páginas 479-508). De modo similar, la supresión de respuesta de anticuerpos maternos contra antígenos fetales por receptores solubles de la presente invención puede ayudar a prevenir defectos del nacimiento y aborto espontáneo. Además, en tales aplicaciones los receptores solubles de la presente invención pueden usarse conjuntamente con otras citoquinas para suprimir algunas actividades del sistema inmune (por ejemplo, proliferación de células B, usando los receptores solubles) pero permitiendo aumentar otros, por ejemplo, en presencia de otras citoquinas descritas aquí y conocidas en la técnica.

Los conjugados de polipéptido de unión bioactivo o anticuerpo descritos aquí pueden entregarse oralmente, intravenosamente, intraarterialmente o intraductalmente, o pueden introducirse localmente en el lugar de acción pretendido. Para uso farmacéutico, el receptor zalfa11 soluble o polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como polipéptidos de receptor zalfa11/IL-2Rγ soluble, de la presente invención se formulan para entrega parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, según métodos convencionales. La administración intravenosa será por inyección de bolus o infusión durante un período típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido de receptor soluble zalfa11 en combinación con un vehículo aceptable farmacéuticamente, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, agentes de conservación, solubilizantes, agentes de tamponación, albúmina para impedir pérdida de proteína en superficies de viales, etc. Los métodos de formulación son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, red., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª ed., 1995. Las dosis terapéuticas estarán generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 μg/kg de peso del paciente por día, preferiblemente 0,5-20 mg/kg por día, determinándose la dosis exacta por el médico según patrones aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad del estado a tratar, los rasgos del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Las proteínas pueden administrarse para tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo durante un período de uno a tres días o pueden usarse en tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad eficaz terapéuticamente de polipéptido de receptor soluble zalfa11 es una cantidad suficiente para producir un efecto significativo clínicamente.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vector de expresión que expresa zalfa11 de longitud completa

El receptor zalfa11 completo se aisló de un plásmido que contenía cADN de receptor zalfa11 (SEQ ID NO: 1) usando PCR con cebadores ZC19,905 (SEQ ID NO: 19) y ZC19,906 (SEQ ID NO: 20). Las condiciones de reacción fueron como sigue: 95ºC durante 1 min; 35 ciclos a 95ºC durante 1 min, 55ºC durante 1 min, 72ºC durante 2 min; seguido por 72ºC en 10 min; y después un remojo a 10ºC. El producto de PCR se hizo pasar sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión del 1% (Boerhinger Mannheim) y se aisló el cADN de zalfa11 de aproximadamente 1,5 kb usando un juego de extracción con gel Qiaquick® (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

El cADN de zalfa11 purificado se digirió con BamHI (Boerhinger Mannheim) y EcoRI (BRL) según las instrucciones del fabricante. El digerido completo se hizo pasar sobre un gel de agarosa de bajo punto de fusión del 1% (Boerhinger Mannheim) y el fragmento de zalfa11 dividido se purificó usando el juego de extracción con gel Qiaquick® (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de zalfa11 dividido resultante se insertó en un vector de expresión como se describe después.

El vector de expresión del receptor pZP-5N se digirió con BamHI (Boerhinger Mannheim) y EcoRI (BRL) según las instrucciones del fabricante, y se purificó con gel como se ha descrito antes. Este fragmento de vector se combinó con el fragmento de zalfa11 dividido con BamHI y EcoRI aislado antes en una reacción de ligación usando T4 Ligase (BRL). La ligación se incubó a 15ºC durante la noche. Una muestra de la ligación se sometió a electroporación a células de *E. coli* electrocompetentes DH10B electroMAX® (25 μF, 200 Ω, 2,3 v). Se pusieron en placa transformantes en placas de LB+ampicilina y se examinron por PCR colonias simples para comprobar la secuencia de zalfa11 usando ZC19,905 (SEQ ID NO: 19) y ZC19,906 (SEQ ID NO: 20) usando las condiciones de PCR descritas antes. La confirmación de la secuencia de zalfa11 se hizo por análisis de secuencia. El inserto era de aproximadamente 1,6 kb, y era de longitud completa.

Ejemplo 2

Proliferación basada en zalfa11 en ensayo de BAF3 usando Alamar Blue

Se construyeron células BaF3 que expresan el receptor zalfa11 de longitud completa, usando el vector de expresión de zalfa11 descrito en el Ejemplo 1. Las células BaF3 que expresan el mARN de receptor zalfa11 se denominaron BaF3/zalfa11. Estas células proporcionan un sistema de ensayo para detectar actividad de Ligando de zalfa11 como se describe después en numerosos Ejemplos. A la inversa, estas células proporcionan también un sistema de ensayo para detectar actividad antagonista o inhibidora de Ligando de zalfa11 por los receptores solubles y anticuerpos de la presente invención.

A. *Construcción de células BaF3 que expresan receptor zalfa11 humano*

BaF3, un linaje celular pre-linfoide dependiente de interleuquina-3 (IL-3) derivado de médula ósea de ratón (Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot *et al., Mol. Cell. Biol.* 6: 4133-4135, 1986), se mantuvo en medio completo (medio RPMI (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) suplementado con 10% de suero de becerro fetal inactivado con calor, 2 ng/ml de IL-3 de ratón (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), L-glutaMax-1® 2 mM (Gibco BRL),

piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL) y antibióticos PSN (GIBCO BRL)). Antes de la electroporación, se preparó ADN plásmido de pZP-5N/zalfa11 (Ejemplo 1) y se purificó usando un juego Qiagen Maxi Prep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Las células BaF3 para electroporación se lavaron una vez en medio RPMI y se resuspendieron después en medio RPMI con una densidad de células de 10^7 células/ml. Un ml de las células BaF3 resuspendidas se mezcló con 30 μg del ADN plásmido de pZP-5N/zalfa11 y se transfirió a cámaras de electroporación desechables separadas (GIBCO BRL). Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, se dio a las células dos sacudidas en serie (800 IFad/300 v; 1180 IFad/300 v) dadas por un aparato de electrporación (CELL-PORATOR®, GIBCO BRL). Después de un tiempo de recuperación de 5 minutos, las células sometidas a electroporación se transfirieron a 50 ml de medio completo y se pusieron en un incubador durante 15-24 horas (37ºC, 5% de CO_2). Las células se centrifugaron después y se resuspendieron en 50 ml de medio completo que contenía selección de Geneticin® (Gibco) (500 μg/ml de G418) en un matraz T-162 para aislar el agrupamiento resistente a G418. Se ensayó la capacidad de señalización como se describe después de agrupamientos de las células BaF3 transfectadas, denominadas en lo sucesivo células BaF3/zalfa11.

B. *Ensayo de la capacidad de señalización de las células BaF3/zalfa11 usando un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

Se centrifugaron células BaF3/zalfa11 y se lavaron en el medio completo, descrito antes, pero sin mIL-3 (al que se hace referencia en adelante como "medio exento de mIL-3"). Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la separación de mIL-3. Se contaron después las células en un hemacitómetro. Se pusieron en placa las células en un formato de 96 pocillos a razón de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl por pocillo usando el medio exento de mIL-3.

Se valoró la proliferación de las células BaF3/zalfa11 usando medio acondicionado de células que expresan Ligando de zalfa11 diluidas con medio exento de mIL-3 hasta concentraciones del 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%; o Ligando de zalfa11 purificado (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) diluido con medio exento de mIL-3 hasta concentraciones de 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml, 1,8 ng/ml, 0,9 ng/ml, 0,5 ng/ml y 0,25 ng/ml. Se añadieron 100 μl de la mTPO diluida a las células BaF3/zalfa11. El volumen de ensayo total es 200 μl. Se hicieron pasar en paralelo testigos negativos usando sólo medio exento de mIL-3. Las placas de ensayo se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 3 días, en cuyo momento se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a razón de 20 μl/pocillo. El Alamar Blue da una lectura fluorométrica basada en la actividad metabólica de células, y es así una medición directa de la proliferación celular en comparación con un testigo negativo. Se incubaron de nuevo las placas a 37ºC y 5% de CO_2 durante durante 24 horas. Se leyeron las placas en el lector de placas Fmax® (Molecular Devices Sunnyvale, CA) usando el programa SoftMax® Pro, con longitudes de onda de 544 (Excitación) y 590 (Emisión). Los resultados confirmaron la capacidad de señalización del receptor zalfa11, porque el Ligando de zalfa11 indujo significativamente proliferación sobre los niveles de fondo.

Ejemplo 3

Examen de Ligando de zalfa11 usando células BaF3/zalfa11 usando un ensayo de proliferación de Alamar Blue

A. *Activación de esplenocitos de mono primarios para ensayar la presencia de Ligando de zalfa11*

Se estimularon *in vitro* esplenocitos de mono para producir medio acondicionado para ensayar la presencia de actividad de Ligando de zalfa11 como se describe después. Se obtuvieron bazos de monos *M. nesestrian* hembras de 8 años de edad. Los bazos se despedazaron para producir una suspensión de células simples. Las células mononucleares se aislaron por gradiente de densidad de Ficoll-Paque® PLUS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las células mononucleares se sembraron a razón de 2 x 10^6 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y se activaron con 5 ng/ml de 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) (Calbiochem, San Diego, CA) y 0,5 mg/ml de Ionomycin® (Calbiochem) durante 48 h. Se usó el sobrenadante de las células de bazo de mono estimuladas para ensayar la proliferación de las células BaF3/zalfa11 como se describe después.

B. *Examen de Ligando de zalfa11 usando células BaF3/zalfa11 usando un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

Se centrifugaron células BaF3/zalfa11 y se lavaron en medio exento de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la separación de mIL-3. Se contaron después las células en un hemacitómetro. Se pusieron en placa las células en un formato de 96 pocillos a razón de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl por pocillo usando el medio exento de mIL-3.

Se valoró la proliferación de las células BaF3/zalfa11 usando medio acondicionado de bazo de mono activado (véase Ejemplo 3A). El medio acondicionado se diluyó con medio exento de mIL-3 hasta concentraciones del 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. Se añadieron 100 μl del medio acondicionado diluido a las células BaF3/zalfa11. El volumen de ensayo total es 200 μl. Las placas de ensayo se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 3 días, en cuyo momento se añadió Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) a razón de 20 μl/pocillo. Se incubaron de nuevo las placas a 37ºC y 5% de CO_2 durante durante 24 horas. Se leyeron las placas en el lector de placas Fmax® (Molecular Devices) como se ha descrito antes (Ejemplo 2).

Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zalfa11 hasta un factor presente en el medio acondicionado de bazo de mono activado. La respuesta, según se midió, era aproximadamente de 4 veces sobre el fondo con la concentración del 50%. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, mostrando que este factor es específico para el receptor zalfa11.

C. *Fuente primaria humana usada para aislar Ligando de zalfa11*

Se tomaron extracciones de sangre de 100 ml de cada uno de seis donantes. La sangre se extrajo usando 10X tubos vacutainer de 10 ml que contenían heparina. Se agrupó sangre de seis donantes (600 ml), se diluyó 1:1 en PBS y se separó usando un Ficoll-Paque® PLUS (Pharmacia Biotech). La producción de células humanas primarias aisladas tras separación en el gradiente de ficoll fue 1,2 x 10^9 células.

Se suspendieron células en 9,6 ml de tampón MACS (PBS, 0,5% de EDTA, EDTA 2 mM). Se separaron 1,6 ml de suspensión de células y se añadieron 0,4 ml de microperlas CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La mezcla se incubó durante 15 min a 4ºC. Estas células marcadas con perlas CD3 se lavaron con 30 ml de tampón MACS y se resuspendieron después en 2 ml de tampón MACS.

Se preparó una columna VS+ (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se puso después en un campo magnético VarioMACS® (Miltenyi). Se equilibró la columna con 5 ml de tampón MACS. Se aplicaron después a la columna las células humanas primarias aisladas. Se dejaron pasar las células negativas en CD3. La columna se enjuagó con 9 ml (3 x 3 ml) de tampón MACS. Se separó después la columna del imán y se puso sobre un tubo falcon de 15 ml. Las células CD3+ se eluyeron añadiendo a la columna 5 ml de tampón MACS y las células unidas se sacaron usando el pistón proporcionado por el fabricante. La incubación de las células con las perlas magnéticas CD3, los lavados y las etapas en la columna VS+ (incubación mediante elución) anteriores se repitieron cinco veces más. Se agruparon las fracciones de CD3+ resultantes de las seis separaciones en columna. La producción de células humanas seleccionadas con CD3+ fue 3 x 10^8 células totales.

Una muestra de las células humanas seleccionadas con CD3+ se separó para coloración y clasificación en un clasificador de células de anticuerpos fluorescentes (FACS) para valorar su pureza. Las células seleccionadas con CD3+ humanas eran 91% de células CD3+.

Las células seleccionadas con CD3+ humanas se activaron incubando en RPMI + 5% de FBS + 10 ng/ml de PMA y 0,5 μg/ml de Ionomycin (Calbiochem) durante 13 horas a 37ºC. Se ensayó la actividad de Ligando de zalfa11 en el sobrenadante de estas células humanas seleccionadas con CD3+ activadas como se describe después. Además, las células humanas seleccionadas con CD3+ activadas se usaron para preparar una genoteca de cADN, como se describe en la Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217.

D. *Ensayo de Ligando de zalfa11 en sobrenadante de células humanas seleccionadas con CD3+ usando células BaF3/zalfa11 y un ensayo de proliferación de Alamar Blue*

Se centrifugaron células BaF3/zalfa11 y se lavaron en medio exento de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la separación de la mIL-3. Se contaron después las células en un hemacitómetro. Se pusieron las células en placa en un formato de 96 pocillos a razón de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl por pocillo usando el medio exento de mIL-3.

La proliferación de las células BaF3/zalfa11 se valoró usando medio acondicionado de células humanas seleccionadas con CD3+ activadas (véase Ejemplo 5C) diluido con medio exento de mIL-3 hasta concentraciones del 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. Se añadieron a las células BaF3/zalfa11 100 μl del medio acondicionado diluido. El volumen de ensayo total es 200 μl. Las placas de ensayo se incubaron y ensayaron como se describe en el Ejemplo 5B.

Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zalfa11 hasta un factor presente en el medio acondicionado de células humanas seleccionadas con CD3+. La respuesta, según se midió, fue aproximadamente de 10 veces sobre el fondo con la concentración del 50%. Las células BaF3 no transfectadas no proliferaron en respuesta a este factor, mostrando que este factor es específico para el receptor zalfa11. Además, el receptor zalfa11 soluble bloqueó esta actividad proliferativa en las células BaF3/zalfa11 (véase Ejemplo 16).

Ejemplo 4

Construcción de vectores de expresión de mamíferos que expresan receptores solubles zalfa11: zalfa11CEE, zalfa11CFLG, zalfa11CHIS y zalfa11-Fc4

A. *Construcción de vector de expresión de mamíferos de zalfa11 que contiene zalfa11CEE, zalfa11CFLG y zalfa11CHIS*

Se preparó un vector de expresión para la expresión del dominio extracelular, soluble, del polipéptido de zalfa11, pC4zalfa11CEE, en el que la construcción se diseña para expresar un polipéptido de zalfa11 constituido por la metio-

nina de iniciación predicha y truncada adyacente al dominio transmembrana predicho, y con una etiqueta Glu-Glu C-terminal (SEQ ID NO: 14).

Se creó un fragmento de ADN de zalfa11 generado por PCR de 700 pb usando como cebadores de PCR ZC19,931 (SEQ ID NO: 21) y ZC19,932 (SEQ NO: 22) para añadir lugares de restricción de Asp718 y BamHI. Se usó como plantilla un plásmido que contiene el cADN de receptor zalfa11 (SEQ ID NO: 1). La multiplicación por PCR del fragmento de zalfa11 se realizó como sigue: Venticinco ciclos a 94ºC durante 0,5 minutos; cinco ciclos a 94ºC durante 10 segundos; 50ºC durante 30 segundos; 68ºC durante 45 segundos, seguido por una detención a 4ºC. La reacción se purificó por extracción con cloroformo/fenol y precipitación con isopropanol, y se digirió con Asp718 y BamHI (Gibco BRL) según el método del fabricante. Se visualizó una banda del tamaño predicho, 700 pb, por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se quitó y se purificó el ADN usando un sistema de purificación QiaexII® (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

El ADN quitado se subclonó en plásmido pC4EE que se había cortado con BamHI y Asp718. El vector de expresión de pC4zalfa11CEE usa el péptido de señal de zalfa11 nativo e incorpora la etiqueta Glu-Glu (SEQ ID NO: 14) al término C de la secuencia de polinucleótido que codifica polipéptido de zalfa11. El plásmido pC4EE es un vector de expresión de mamífero que contiene una cassette de expresión que tiene el promotor de metalotioneína-1 de ratón, lugares de restricción múltiples para la inserción de secuencias de codificación, un codón de detención y un terminador de hormona del crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de E. coli, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, aumentador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40.

Aproximadamente 30 ng del inserto de zalfa11 digerido con restricción y aproximadamente 12 ng del vector digerido se ligaron durante la noche a 16ºC. Un microlitro de cada reacción de ligación se sometió a electroporación independientemente en células competentes DH10B (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) según la instrucción del fabricante y se pusieron en placas LB que contenían 50 mg/ml de ampicilina, y se incubaron durante la noche. Se examinaron colonias por análisis de restricción de ADN preparado a partir de 2 ml de cultivos líquidos de colonias individuales. La secuencia de inserto de clones positivos se verificó por análisis de secuencia. Se hizo una preparación de plásmido a gran escala usando un juego QIAGEN® Maxi prep (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Se usó el mismo procedimiento para preparar los receptores solubles zalfa11 con una etiqueta his C-terminal, compuestos por 6 residuos His en una fila; y una etiqueta flag C-terminal (SEQ ID NO: 23), zalfa11CFLAG. Para construir estas construcciones, el vector antedicho tiene la HIS o la etiqueta FLAG® en lugar de la etiqueta glu-glu (SEQ ID NO: 14).

B. *Construcción de expresión de mamífero de receptor zalfa11 soluble zalfa11-Fc4*

Se construyó mediante recombinación homóloga un plásmido de expresión que contiene la totalidad o parte de un polinucleótido que codifica zalfa11. Se aisló un fragmento de cADN de zalfa11 usando PCR, que incluye la secuencia de polinucleótido de dominio extracelular del receptor zalfa11. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de zalfa11 fueron: (1) Los cebadores para PCR incluyen cada uno del extremo 5' al 3': 40 pb de la secuencia flanqueante del vector (5' del inserto) y 17 pb correspondientes al extremo 5' del dominio extracelular de zalfa11 (SEQ ID NO: 24); y (2) 40 pb del extremo 5' de la secuencia de polinucleótido de Fc4 (SEQ ID NO: 25) y 17 pb correspondientes al extremo 3' del dominio extracelular de zalfa11 (SEQ ID NO: 26). El fragmento de Fc4 para fusión con el zalfa11 se generó por PCR de manera similar. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de Fc4 fueron: (1) un cebador 5' consistente en 40 pb de secuencia del extremo 3' de dominio extracelular de zalfa11 y 17 pb del extremo 5' de Fc4 (SEQ ID NO: 27); y (2) un cebador 3' consistente en 40 pb de secuencia de vector (3' del inserto) y 17 pb del extremo 3' de Fc4 (SEQ ID NO: 28).

La multiplicación por PCR de cada una de las reacciones descritas antes se realizó como sigue: un ciclo a 94ºC durante 2 minutos; venticinco ciclos a 94ºC durante 30 segundos, 60ºC durante 30 segundos, 72ºC durante 1 minuto; un ciclo a 72ºC durante 5 minutos; seguido por una detención a 4ºC. Diez μl de los 100 μl de la reacción PCR se hicieron pasar sobre un gel de LMP agarosa del 0,8% (Seaplaque GTG) con 1 x tampón TBE para análisis. Los restantes 90 μl de la reacción PCR se precipitaron con adición de 5 μl de NaCl 1 M y 250 μl de etanol absoluto. El vector de expresión usado se derivó del plásmido pCZR199 (depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, designado Nº 98668). y se cortó con SmaI (BRL). El vector de expresión se derivó del plásmido pCZR199, y es un vector de expresión de mamífero que contiene una cassette de expresión que tiene el promotor temprano inmediato de CMV, un intrón de consenso de la región variable de un sitio de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, lugares de restricción múltiples para inserción de secuencias de codificación, un codón de detención y un terminador de hormona del crecimiento humano. El vector de expresión tiene también un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor de SV40, aumentador y origen de replicación, un gen de DHFR y el terminador de SV40. El vector de expresión usado se construyó a partir de pCZR199 por sustitución del promotor de metalotioneína por el promotor temprano inmediato de CMV.

Se combinaron cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 μl que contenían aproximadamente 1 μg de cada uno de los insertos zalfa11 y Fc4 y 100 ng de vector de expresión digerido con SmaI (BRL), y se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las mezclas de levadura/ADN se electropulsaron a 0,75

kv (5 kv/cm), "infinitos" ohmios, 25 μF. Se añadieron a cada cubeta 600 μl de sorbitol 1,2 M y se puso en placa la levadura en dos partes alícuotas de 300 μl en dos placas URA-D y se incubaron a 30ºC.

Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una placa simple se resuspendieron en 1 ml de H_2O y se centrifugaron brevemente para globulizar las células de levadura. El glóbulo de células se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (2% de Triton X-100, 1% de SDS, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Quinientos microlitros de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 300 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 μl de fenol-cloroformo, se sometieron a vórtice durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido por una centrifugación de 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron trecientos microlitros de la fase acuosa a un nuevo tubo, y se precipitó el ADN con 600 μl de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 10 minutos a 4ºC. El glóbulo de ADN se resuspendió en 100 μl de H_2O.

La transformación de células de *E. coli* electrocompetentes (DH10B, GibcoBRL) se hace con 0,5-2 ml de prep de ADN de levadura y 40 μl de células DH10B. Las células se electropulsaron a 2,0 kv, 25 mF y 400 ohmios. Después de la electroporación, se pusieron en placas 1 ml de SOC (2% de triptona Bacto® (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extracto de levadura (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) en partes alícuotas de 250 μl sobre cuatro placas LB AMP (caldo LB (Lennox), 1,8% de Bacto Agar (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

Se identificaron clones individuales que albergaban la construcción de expresión correcta para zalfa11-Fc4 digiriendo con restricción para verificar la presencia del inserto de zalfa11-Fc4 y confirmar que las diversas secuencias de ADN se habían unido correctamente entre sí. El inserto de clones positivos se sometió a análisis de secuencia. Se aísla ADN plásmido a mayor escala usando el juego Qiagen Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5

Transfección y expresión de polipéptidos de receptor soluble zalfa11

Se pusieron en placa células BHK 570 (ATCC Nº CRL-10314), paso 27, a razón de 1,2 x 10^6 células/pocillo (placa de 6 pocillos) en 800 μl de medio DMEM exento de suero (SF) (DMEM, Gibco/BRL alto contenido de glucosa) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Las células se transfectaron con plásmidos de expresión que contenían zalfa11CEE, zalfa11CFLG o zalfa11CHIS descritos antes (véase Ejemplo 4) usando Lipofectin® (Gibco BRL), en DMEM exento de suero (SF). Se diluyeron cada uno separadamente tres microgramos de zalfa11CEE, zalfa11CFLG o zalfa11CHIS en tubos de 1,5 ml hasta un volumen final total de 100 μl de DMEM SF. La mezcla de Lipofectin® se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos, se añadió después la mezcla de ADN y se dejó incubar aproximadamente 10-15 minutos a temperatura ambiente.

La mezcla ADN:Lipofectin® completa se añadió a las células en placa y se distribuyó uniformemente sobre ellas. Se incubaron las células a 37ºC durante aproximadamente cinco horas y se transfirieron después a placas MAXI de 150 mm separadas en un volumen final de 30 ml de DMEM/5% de suero de bovino fetal (FBS) (Hyclone, Logan, UT). Se incubaron las placas a 37ºC y 5% de CO_2, durante la noche y la mezcla ADN:Lipofectin® se sustituyó por medio de selección (5% de FBS/DMEM con metotrexato 1 μM (MTX)) al día siguiente.

Aproximadamente 10-12 días post-transfección, se lavaron las placas con 10 ml de DMEM SF. El medio de lavado se aspiró y sustituyó por 7,25 ml de DMEM exento de suero. Se pusieron después sobre las colonias de células clónicas mallas de teflón estériles (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA) pre-empapadas en DMEM SF. Se puso después sobre la malla un filtro de nitrocelulosa estéril pre-empapado en DMEM SF. Se transfirieron a la placa de cultivo marcas de orientación en la nitrocelulosa. Se incubaron después las placas durante 5-6 horas en un incubador a 37ºC y con 5% de CO_2.

Tras la incubación, se separaron los filtros/mallas, y se aspiraron los medios y sustituyeron por 5% de FBS/DMEM con MTX 1 μM. Se bloquearon después los filtros en 10% de leche desnatada en polvo/tampón Western A (Western A: Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, 0,05% de NP-40, NaCl 150 mM y 0,25% de gelatina) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un sacudidor rotativo. Se incubaron después los filtros con conjugados anti-Glu-Glu, anti-FLAG® o anticuerpo anti-HIS-HRP, respectivamente, en 2,5% de leche desnatada en polvo/tampón Western A durante una hora a temperatura ambiente en un sacudidor rotativo. Se lavaron después los filtros tres veces a temperatura ambiente con Western A durante 5-10 minutos por lavado. Se revelaron los filtros con reactivo ultra ECL (Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las instrucciones del fabricante y se visualizaron en el Lumi-Imager (Roche Corp.).

Se llevaron mecánicamente colonias clónicas de expresión positiva a placas de 12 pocillos en un ml de 5% de FCS/DMEM con MTX 5 μM, y se desarrollaron después hasta confluencia. Se ensayaron después niveles de expresión en muestras de medio acondicionado mediante SDS-PAGE y análisis de Western. Se tomaron los tres clones de expresión más elevada para cada construcción; dos de los tres se congelaron como soporte y uno de expandió para ensayo de micoplasma y siembra de fábrica a gran escala.

B. *Expresión en mamíferos de receptor zalfa11 soluble zalfa11-Fc4*

Se pusieron en placa células BHK 570 (ATCC Nº: CRL-10314) en placas de cultivo de tejidos de 10 cm y se las dejó crecer hasta aproximadamente 50 a 70% de confluencia durante la noche a 37ºC y 5% de CO_2, en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL alto contenido de glucosa) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% de suero de bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato sódico 1 mM (Gibco BRL)). Se transfectaron después las células con el plásmido que contenía zalfa11-Fc4 (véase Ejemplo 9), usando Lipofectamine® (Gibco BRL), en formulación de medio exento de suero (SF) (DMEM, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuína, 1% de L-glutamina y 1% de piruvato sódico). El plásmido que contenía zalfa11-Fc4 se diluyó en tubos de 15 ml hasta un volumen final total de 640 ml con medio SF. Se mezclaron 35 ml de Lipofectamine® (Gibco BRL) con 605 ml de medio SF. La mezcla de Lipofectamine® se añadió a la mezcla de ADN y se dejó incubar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a la mezcla de ADN-Lipofectamine® cinco mililitros de medio SF. Las células se enjuagaron una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron y se añadió la mezcla de ADN-Lipofectamine®. Se incubaron las células a 37ºC durante cinco horas y se añadieron después a cada placa 6,4 ml de medio DMEM/10% de FBS, 1% de PSN. Se incubaron las células a 37ºC durante la noche y se sustituyó la mezcla de ADN-Lipofectamine® por medio 5% de FBS/DMEM nuevo el día siguiente. El día 2 post-transfección se dividieron las células en el medio de selección (medio DMEM/FBS de antes con adición de metotrexato 1 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)) en placas de 150 mm a 1:10, 1:20 y 1:50. El medio en las células se sustituyó por medio de selección nuevo al día 5 post-transfección. Aproximadamente 10 días post-transfección, dos placas de cultivo de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato de cada transfección se tripsinizaron, y las células se agruparon y pusieron en placa en un matraz T-162 y se transfirieron a un cultivo a gran escala.

Ejemplo 6

Purificación de receptores solubles zalfa11 de células BHK 570

A. *Purificación de polipéptido de zalfa11CEE de BHK 570*

Salvo indicación en contrario, todas las operaciones se realizaron a 4ºC. Se usó el siguiente procedimiento para purificar polipéptido de zalfa11 que contiene etiquetas GluGlu (EE) C-terminales. Treinta litros de medio acondicionado de fábrica de células se concentraron hasta 1.6 litros con un cartucho espiral Amicon S10Y3 en un ProFlux A30. Se añadió una solución de inhibidor de proteasa a los 1,6 litros concentrados de medio acondicionado de fábrica de células a partir de células BHK 570 transfectadas (Ejemplo 5) hasta concentraciones finales de ácido etilendiaminatetraacético 2,5 mM (EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), leupeptina 0,003 mM (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), pepstatina 0,001 mM (Boehringer-Mannheim) y Pefabloc 0,4 mM (Boehringer-Mannheim). Se separaron muestras para análisis y la mayor parte del volumen se congeló a -80ºC hasta iniciar la purificación. Las concentraciones de proteínas objetivo totales del medio acondicionado de fábrica de células concentrado se determinaron por SDS-PAGE y análisis de manchas de Western con el anticuerpo conjugado anti-EE HRP.

Una columna de 100 ml de anti-EE G-Sepharose (preparada como se describe después) se vertió en una columna de vidrio de 5 cm x 10 cm Waters AP-5. La columna se llenó de flujo y se equilibró en una BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El medio acondicionado de fábrica de células concentrado se descongeló, se sometió a filtración estéril a través de 0,2 micrómetros, se ajustó el pH en 7,4 y se cargó después en la columna durante la noche con un caudal de 1 ml/minuto. Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna (CVs) de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se eluyó después por descarga con 200 ml de PBS (pH 6,0) que contenía 0,5 mg/ml de péptido EE (Anaspec, San Jose, CA) a razón de 5 ml/minuto. El péptido EE usado tiene la secuencia EYMPME (SEQ ID NO: 14). Se lavó la columna por 10 CVs con PBS y se eluyó después con 5 CVs de glicina 0,2 M, pH 3.0. El H de la columna eluída con glicina se ajustó en 7,0 con 2 CVs de 5X PBS y se equilibró después en PBS (pH 7,4). Se recogieron fracciones de 5 ml durante la cromatografía de la elución completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm; Se guardaron y analizaron también el paso a través y los agrupamientos de lavados. Se analizó la proteína objetivo en las fracciones de pico de elución de polipéptido de EE mediante coloración de SDS-PAGE Silver y Manchas de Western con el anticuerpo conjugado anti-EE HRP. Las fracciones de elución de polipéptido de interés se agruparon y concentraron de 60 ml a 5,0 ml usando un concentrador por centrifugación con membrana de corte de peso molecular 10.000 Daltons (Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante.

Para separar zalfa11CEE de otras proteínas de co-purificación, las fracciones agrupadas de eleción de polipéptido concentrado se sometieron a POROS HQ-50 (resina de intercambio de aniones fuertes de PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) a pH 8,0. Se vertió una columna de 1,0 x 6,0 cm y se llenó de flujo en una BioCad Sprint. La columna se cargó de iones opuestos y se equilibró después en TRIS 20 mM pH 8,0 (Tris)Hidroximetil Aminometano)). La muestra se diluyó 1:13 (para reducir la fuerza iónica de PBS) y se cargó después en la columna Poros HQ a razón de 5 ml/minuto. Se lavó la columna por 10 CVs con Tris 20 mM pH 8,0 y se eluyó después con un gradiente de 40 CV de Tris 20 mM/cloruro sódico 1 M (NaCl) a razón de 10 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 1,5 ml durante la cromatografía completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de pico de elución se analizaron mediante coloración SDS-PAGE Silver. Las fracciones de interés se agruparon y concentraron hasta 1,5-2 ml usando un concentrador por centrifugación con membrana de corte de peso molecular 10.000 Daltons (Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante.

Para separar polipéptido de zalfa11CEE del péptido EE libre y cualesquiera proteínas de co-purificación contaminantes, las fracciones concentradas agrupadas se sometieron a cromatografía en una columna Sephadex S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) de 1,5 x 90 cm equilibrada y cargada en PBS con un caudal de 1,0 ml/min usando una BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a lo largo de la cromatografía completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de pico se caracterizaron mediante coloración SDS-PAGE Silver, y sólo se agruparon las fracciones más puras. Este material representaba polipéptido de zalfa11CEE purificado.

Este material purificado se sometió finalmente a una columna ActiClean Etox de 4 ml (Sterogene) para separar cualesquiera endotoxinas restantes. La muestra se hizo pasar sobre la columna de gravedad equilibrada con PBS cuatro veces y se lavó después la columna con un volumen simple de 3 ml de PBS, que se agrupó con la muestra "limpia". El material se filtró después estérilmente a través de 0,2 micrómetros y se guardó a -80ºC hasta que se dividió en partes alícuotas.

En geles de manchas de Western, de SDSPAGE coloreados con Coomassie Blue y Silver, el polipéptido de zalfa11CEE tenía una banda principal de un peso molecular aparente de 50.000 Daltons. La movilidad de esta banda fur la misma en geles reductores y no reductores.

La concentración de proteína del material purificado se realizó por análisis BCA (Pierce, Rockford, IL) y la proteína se dividió en partes alícuotas y guardo a -80ºC según procedimientos estándares. En geles de IEF (enfoque isoeléctrico) la proteína pasa con un PI inferior a 4,5. La concentración de polipéptido de zalfa11CEE fue 1,0 mg/ml.

Se preparó polipéptido de zalfa11CEE purificado para inyección en conejos y se envió a R & R Research and Development (Stanwood, WA) para producción de anticuerpo. Se inyectaron los conejos para producir suero antihuzalfa11-CEE BHK (siguiente Ejemplo 10).

Para preparar anti-EE Sepharose, un volumen de lecho de 100 ml de proteína G-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) se lavó 3 veces con 100 ml de PBS que contenía 0,02% de azida sódica usando una unidad de filtro de 0,45 micrómetros Nalgene de 500 ml. El gel se lavó con 6,0 volúmenes de trietanolamina 200 mM, pH 8,2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO), y se añadió un volumen igual de solución de anticuerpo de EE que contenía 900 mg de anticuerpo. Después de una incubación durante la noche a 4ºC, se separó el anticuerpo no unido lavando la resina con 5 volúmenes de TEA 200 mM como se ha descrito antes. La resina se resuspendió en 2 volúmenes de TEA, se transfirió a un recipiente adecuado y se añadió pimilimidato de dimetilo-2HCl (Pierce, Rockford, IL) disuelto en TEA hasta una concentración final de 36 mg/ml de gel de proteína G-Sepharose. El gel se meció a temperatura ambiente durante 45 min y se separó el líquido usando la unidad de filtro como se ha descrito antes. Se bloquearon después lugares no específicos del gel incubando durante 10 min, a temperatura ambiente, con 5 volúmenes de etanolamina 20 mM en TEA 200 mM. Se lavó después el gel con 5 volúmenes de PBS que contenía 0,02% de azida sódica y se guardó en esta solución a 4ºC.

B. *Purificación de polipéptido de zalfa11CFLAG de BHK 570*

Salvo indicación en contrario, todas las operaciones se realizaron a 4ºC. Se usó el siguiente procedimiento para purificar polipéptido de zalfa11 que contiene etiquetas FLAG® (FLG) (Sigma-Aldrich Co.) C-terminales. Treinta litros de medio acondicionado de fábrica de células se concentraron hasta 1.7 litros con un cartucho espiral Amicon S10Y3 en un ProFlux A30. Se añadió una solución de inhibidor de proteasa a los 1,7 litros de medio acondicionado de fábrica de células concentrado a partir de células BHK 570 transfectadas (véase Ejemplo 5) hasta concentraciones finales de ácido etilendiaminatetraacético 2,5 mM (EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), leupeptina 0,03 mM (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), pepstatina 0,001 mM (Boehringer-Mannheim) y Pefabloc 0,4 mM (Boehringer-Mannheim). Se separaron muestras para análisis y la mayor parte del volumen se congeló a -80ºC hasta iniciar la purificación. Las concentraciones de proteínas objetivo totales del medio acondicionado de fábrica de células se determinaron por SDS-PAGE y análisis de manchas de Western con el anticuerpo conjugado anti-FLAG® (Kodak) HRP. Una columna de 125 ml de gel de afinidad de M2-Agarose de anti-FLAG® (Sigma-Aldrich Co.) se vertió en una columna de vidrio de 5 cm x 10 cm Waters AP-5. La columna se llenó de flujo y se equilibró en una BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El medio acondicionado de fábrica de células concentrado se descongeló, se sometió a filtración estéril a través de 0,2 micrómetros, se ajustó el pH en 7,4 y se cargó después en la columna durante la noche con un caudal de 1 ml/minuto. Se lavó la columna con 10 volúmenes de columna (CVs) de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) y se eluyó después por descarga con 250 ml de PBS (pH 6,0) que contenía 0,5 mg/ml de péptido FLAG® (Sigma-Aldrich Co.) a razón de 5 ml/minuto. El péptido FLAG® usado tiene la secuencia DYKDDDDK (SEQ ID NO: 23). Se lavó la columna por 10 CVs con PBS y se eluyó después con 5 CVs de glicina 0,2 M, pH 3.0. El H de la columna eluída con glicina se ajustó en 7,0 con 2 CVs de 5X PBS y se equilibró después en PBS (pH 7,4). Se recogieron fracciones de cinco ml durante la cromatografía de la elución completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm; se guardaron y analizaron también el paso a través y los agrupamientos de lavados. Se analizó la proteína objetivo en las fracciones de pico de elución de polipéptido de FLAG® mediante coloración de SDS-PAGE Silver y Manchas de Western con el anticuerpo conjugado anti-FLAG HRP. Las fracciones de elución de polipéptido de interés se agruparon y concentraron de 80 ml a 12 ml usando un concentrador por centrifugación con membrana de corte de peso molecular 10.000 Daltons (Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante.

Para separar zalfa11CFLG de otras proteínas de co-purificación, las fracciones agrupadas de elución de polipéptido se sometieron a POROS HQ-50 (resina de intercambio de aniones fuertes de PerSeptive BioSystems, Framingham,

MA) a pH 8,0. Se vertió una columna de 1,0 x 6,0 cm y se llenó de flujo en una BioCad Sprint. La columna se cargó de iones opuestos y se equilibró después en TRIS 20 mM pH 8,0 (Tris)Hidroximetil Aminometano)). La muestra se diluyó 1:13 (para reducir la fuerza iónica de PBS) y se cargó después en la columna Poros HQ-50 a razón de 5 ml/minuto. Se lavó la columna por 10 volúmenes de columna (CVs) con Tris 20 mM pH 8,0 y se eluyó después con un gradiente de 40 CV de Tris 20 mM/cloruro sódico 1 M (NaCl) a razón de 10 ml/minuto. Se recogieron fracciones de 1,5 ml durante la cromatografía completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de pico de elución se analizaron mediante coloración SDS-PAGE Silver. Las fracciones de interés se agruparon y concentraron hasta 1,5-2 ml usando un concentrador por centrifugación con membrana de corte de peso molecular 10.000 Daltons (Millipore, Bedford, MA) según las instrucciones del fabricante.

Para separar polipéptido de zalfa11CFLG del péptido FLAG® libre y cualesquiera proteínas de co-purificación contaminantes, las fracciones concentradas agrupadas se sometieron a cromatografía en una columna Sephacrfyl S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) de 1,5 x 90 cm equilibrada y cargada en PBS con un caudal de 1,0 ml/min usando una BioCad Sprint. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a lo largo de la cromatografía completa y se comprobó la absorbancia a 280 y 215 nm. Las fracciones de pico se caracterizaron mediante coloración SDS-PAGE Silver, y sólo se agruparon las fracciones más puras. Este material representaba polipéptido de zalfa11CFLG purificado.

Este material purificado se sometió finalmente a una columna ActiClean Etox de 4 ml (Sterogene) para separar cualesquiera endotoxinas restantes. La muestra se hizo pasar sobre la columna de gravedad equilibrada con PBS cuatro veces y se lavó después la columna con un volumen simple de 3 ml de PBS, que se agrupó con la muestra "limpia". El material se filtró después estérilmente a través de 0,2 micrómetros y se guardó a -80ºC hasta que se dividió en partes alícuotas.

En geles de manchas de Western, de SDSPAGE coloreados con Coomassie Blue y Silver, el polipéptido de zalfa11CFLG tenía una banda principal de un peso molecular aparente de 50.000 Daltons. La movilidad de esta banda fur la misma en geles reductores y no reductores.

La concentración de proteína del material purificado se realizó por análisis BCA (Pierce, Rockford, IL) y la proteína se dividió en partes alícuotas y guardo a -80ºC según procedimientos estándares. En geles de IEF (enfoque isoeléctrico) la proteína pasa con un PI inferior a 4,5. La concentración de polipéptido de zalfa11CEE fue 1,0 mg/ml.

C. *Purificación de polipéptido de zalfa1q1-Fc4 de células BHK 570 tranfectadas*

Salvo indicación en contrario, todas las operaciones se realizaron a 4ºC. Se usó el siguiente procedimiento para purificar polipéptido de zalfa11 que contiene fusión C-terminal a IgG/Fc humana (zalfa11-Fc4; Ejemplos 4 y 5). Se filtraron 12.000 ml de medio acondicionado de células BHK 570 transfectadas con zalfa11-Fc4 (Ejemplo 5) a través de un filtro esterilizante de 0,2 mm y se suplementaron después con una solución de inhibidores de proteasa, hasta concentraciones finales de leupeptina 0,001 mM (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), pepstatina 0,001 mM (Boehringer-Mannheim) y Pefabloc 0,4 mM (Boehringer-Mannheim). Se llenó con una proteína sepharose G (volumen de lecho 6 ml, Pharmacia Biotech) y se lavó con 500 ml de PBS (Gibco/BRL). El medio acondicionado suplementado se hizo pasar sobre la columna con un caudal de 10 ml/minuto, seguido por lavado con 1.000 ml de PBS (BRL/Gibco). Se eluyó zalfa11-Fc4 de la columna con glicina 0,1 M pH 3,5 y se recogieron directamente fracciones de 2 ml en 0,2 ml de Tris 2 M pH 8,0, para ajustar el pH final en 7,0 en las fracciones.

Las fracciones eluídas se caracterizaron por SDS-PAGE y manchas de Western con anticuerpos anti-Fc humano (Amersham). El análisis de manchas de Western de geles de SDS-PAGE reductores reveló una proteína inmunorreactiva de 80.000 kDa en las fracciones 2-10. Los geles de SDS-PAGE coloreados de plata revelaron también un polipéptido de zalfa11:Fc de 80.000 kDa en las fracciones 2-10. Se agruparon las fracciones 2-10.

La concentración de proteína de las fracciones agrupadas se realizó por análisis BCA (Pierce, Rockford, IL) y el material se dividió en partes alícuotas y guardó a -80ºC según los procedimientos estándares de los inventores. La concentración de las fracciones agrupadas fue 0,26 mg/ml.

Ejemplo 7

Ensayo usando receptores solubles zalfa11CEE, zalfa11CFLG y zalfa11Fc4 de receptor soluble zalfa11 en ensayo de inhibición competitivo

Se centrifugaron células BaF3/zalfa11 y se lavaron en medio exento de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la separación de la mIL-3. Se contaron después las células en un hemacitómetro. Se pusieron las células en placa en un formato de 96 pocillos a razón de 5.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl por pocillo usando el medio exento de mIL-3.

Ambos medios de la activación de células de bazo de mono y las células seleccionadas CD3+, descritos en el Ejemplo 3, se añadieron en experimentos separados en concentraciones del 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%, con o sin receptores solubles zalfa11 (construcciones CEE, C-etiqueta y Fc4; véase Ejemplo 6) a razón de 10 μg/ml. El volumen de ensayo total fue 200 μl.

Las placas de ensayo se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 3 días, en cuyo momento se añadió Alamar Blue (Accumed) a razón de 20 µl/pocillo. Se incubaron de nuevo las placas a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24 horas. Se leyeron las placas en el lector de placas Fmax® (Molecular Devices) como se ha descrito antes (Ejemplo 2). Los resultados demostraron inhibición completa del crecimiento de células de cada una de las diferentes construcciones de receptor soluble zalfa11 con 10 µg/ml, confirmando que el factor en cada muestra era específico para el receptor zalfa11.

Se hicieron también curvas de titulación, diluyendo los receptores solubles, usando el ensayo indicado antes. Ambos receptores zalfa11 solubles zalfa11CEE y zalfa11CFLG eran capaces de inhibir completamente el crecimiento con tan bajo como 20 ng/ml. El receptor zalfa11 soluble zalfa11-Fc4 era sólo tan eficaz con 1,5 µg/ml.

Ejemplo 8

Expresión de receptor soluble zalfa11 humano en E. coli

A. *Construcción de vector de expresión pCZR225 que expresa polipéptido de fusión de huzalfa11/MBP-6H*

Se construyó mediante recombinación homóloga un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codifica un receptor soluble zalfa11 humano fusionado C-terminalmente a proteína de unión a maltosa (MBP). La secuencia de polinucleótido para el polipéptido de fusión de MBP-receptor soluble zalfa11 se muestra en SEQ ID NO: 29, mostrándose la secuencia de proteína correspondiente en SEQ ID NO: 30. El polipéptido de fusión, denominado huzalfa11/MBP-6H, en el Ejemplo 9, contiene una porción de MBP (aminoácido 1 (Met) a aminoácido 388 (Ser) de SEQ ID NO: 30) fusionada al receptor soluble zalfa11 humano (aminoácido 389 (Cys) a aminoácido 606 (His) de SEQ ID NO: 30). Un fragmento de cADN de zalfa11 humano (SEQ ID NO: 31) se aisló usando PCR. Se usaron dos cebadores en la producción de fragmento de zalfa11 humano en una reacción PCR: (1) cebador ZC20,187 (SEQ ID NO: 32), que contiene 40 pb de la secuencia flanqueante de vector y 25 pb correspondientes al término amino del zalfa11 humano, y (2) cebador ZC20,185 (SEQ ID NO: 33), que contiene 40 pb del extremo 3' correspondientes a la secuencia de vector flanquean te y 25 pb correspondientes al término carboxilo del zalfa11 humano. Las condiciones de reacción PCR fueron como sigue: 25 ciclos de 94ºC durante 30 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 1 minuto; seguido por remojo a 4ºC, realizadas por duplicado. Dos µl de los 100 µl de reacción PCR se hicieron pasar sobre un gel de agarosa del 1,0% con 1 x tampón TBE para análisis, y se vio el fragmento de aproximadamente 660 pb esperado. Los restantes 90 µl de reacción PCR se combinaron con el segundo tubo de PCR precipitado con 400 µl de etanol absoluto. El ADN precipitado se usó para recombinar en el vector receptor cortado con SmaI pTAP98 para producir la construcción que codifica la fusión MBP-zalfa11, como se describe después.

El plásmido pTAP98 se derivó de los plásmidos pRS316 y pMAL-c2. El plásmido pRS316 es un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter P. y Sikorski, R., *Genetics* 122: 19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) es un plásmido de expresión de *E. coli*. Lleva el promotor tac que dirige *MalE* (gen que codifica MBP) seguido por una etiqueta His, un lugar de división de trombina, un lugar de clonación y el terminador *rrnB*. El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levadura. Se recombinaron 100 ng de pMAL-c2 cortado con EcoRI con 1 µg de pRS316 cortado con Pvu1, 1 µg de enlazador y 1 µg de pRS316 cortado con Sca1/EcoRI. El enlazador consistía en los óligos ZC19,372 (SEQ ID NO: 34) (100 pmoles): ZC19,351 (SEQ ID NO: 35) (1 pmol): ZC19,352 (SEQ ID NO: 36) (1 pmol) y ZC19,371 (SEQ ID NO: 37) (100 pmoles) combinados en una reacción PCR. Las condiciones de reacción PCR fueron como sigue: 10 ciclos de 94ºC durante 30 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 30 segundos; seguido por remojo a 4ºC. Los productos de PCR se concentraron mediante precipitación con etanol del 100%.

Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 µl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 µg del anterior producto de PCR receptor zalfa11 humano y 100 ng de vector pTAP98 digerido con SmaI, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla levadura/ADN se electropulsó a 0,75 kv, infinitos ohmios, 25 µF. Se añadieron a cada cubeta 600 µl de sorbitol 1,2 M y se puso después en placa la levadura en dos partes alícuotas de 300 µl sobre dos placas URA D y se incubó a 30ºC.

Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura de Ura+ de una placa simple se resuspendieron en 1 ml de H_2O y se centrifugaron brevemente para globulizar las células de levadura. El glóbulo de células se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (2% de Triton X-100, 1% de SDS, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Quinientos microlitros de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contenía 300 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 µl de fenol-cloroformo y se sometieron a vórtice durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido por una centrifugación de 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Se transfirieron a un tubo nuevo trescientos microlitros de la fase acuosa, y el ADN precipitó con 600 µl de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 10 minutos a 4ºC. El glóbulo de ADN se resuspendió en 100 µl de H_2O.

La transformación de células de *E. coli* electrocompetentes (MC1061, Casadaban *et al. J. Mol. Biol.* 138, 179-207) se hizo con 1 µl de prep de ADN de levadura y 40 µl de células MC1061. Las células se electropulsaron a 2,0 kv, 25 µF y 400 ohmios. Tras la electroporación, se pusieron en placa 0,6 ml de SOC (2% de Bacto® triptona (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extracto de levadura (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) en una parte alícuota en placas de 100 mg/l de MM/CA + AMP (Pryor y Leiting, *Protein Expression and Purification* 10: 309-319, 1997).

Se identificaron por expresión células que albergan la construcción de expresión correcta para receptor zalfa11 humano. Se desarrollaron las células en MM/CA con 100 μg/ml de ampicilina durante dos horas, sacudiendo, a 37ºC. Se indujo 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. 2-4 horas más tarde se mezclaron los 250 μl de cada cultivo con 250 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 μl de tampón de Thorner con 5% de βME y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, 10% de glicerol, EDTA 2 mM, 5% de SDS). Se sometieron a vórtice muestras durante un minuto y se calentaron a 65ºC durante 10 minutos. Se cargaron 20 μl por pista en un gel de 4%-12% vde PAGE (NOVEX). Se hicieron pasar geles en tampón 1XMES. Los clones positivos se denominaron pCZR225 y se sometieron a análisis de secuencia. La secuencia de polinucleótido de la fusión MBP-zalfa11 es muestra en SEQ ID NO: 50.

B. *Expresión bacteriana de polipéptido de fusión huzalfa11 humano/MBP-6H*

Se usó un microlitro de ADN de determinación de secuencia para transformar cepa BL21. Las células se electropulsaron a 2,0 kv, 25 μF y 400 ohmios. Tras la electroporación, 0,6 ml de MM/CA con 100 mg/l de ampicilina.

Se desarrollaron las células en MM/CA con 100 mg/l de ampicilina durante dos horas, sacudiendo, a 37ºC. Se indujo 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. Los 250 μl de cada cultivo se mezclaron 2-4 horas más tarde con 250 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 μl de tampón de Thorner con 5% de βME y colorante (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, 0,10% de glicerol, EDTA 2 mM, 5% de SDS). Se sometieron a vórtice las muestras durante un minuto y se calentaron a 65ºC durante 10 minutos. Se cargaron 20 μl por pista en gel de 4%-12% de PAGE (NOVEX). Se hicieron pasar los geles en tampón 1XMES. Los clones positivos se usaron para desarrollar purificación de proteína de la proteína de la fusión huzalfa11/MBP-6H (Ejemplo 9 siguiente).

Ejemplo 9

Purificación de receptor soluble huzalfa11/MBP-6H de la fermentación de E. coli

Salvo indicación en contrario, todas las operaciones se realizaron a 4ºC. Se usó el siguiente procedimiento para purificar polipéptido de receptor soluble huzalfa11/MBP-6H. Se desarrollaron células de *E. coli* que contenían la construcción pCZR225 y que expresaban receptor soluble huzalfa11/MBP-6H (Ejemplo 8) en SuperBroth II (12 g/l de caseína, 24 g/l de extracto de levadura, 11,4 g/l de fosfato dipotásico, 1,7 g/l de fosfato monopotásico; Becton Dickenson, Cockeysville, MD) y se congelaron en glicerol del 0,5%. Veinte gramos de las células congeladas en SuperBroth II + glicerol se usaron para purificar la proteína. Las células congeladas se descongelaron y diluyeron 1:10 en una solución de inhibidor de proteasa (tampón de extracción) antes de lisar las células y liberar la proteína de receptor soluble huzalfa11/MBP-6H. Las células diluidas contenían concentraciones finales de Tris 20 mM (JT Baker, Philipsburg, NJ), cloruro sódico 100 mM (NaCl, Mallinkrodt, Paris, KY), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM (PMSF, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 2 μg/ml de leupeptina (Fluka, Suiza) y 2 μg/ml de aprotinina (Sigma). Se usó para lisar las células un sistema de rotura de células de prensa francesa (Constant Systems Ltd., Warwick, R.U.) con una temperatura de -7 a -10ºC y 2.100 kg/cm^2. Se comprobó la rotura de las células lisadas por lecturas A_{600} antes y después de la prensa francesa. Las células lisadas se centrifugaron a 18.000 G durante 45 minutos para separar los restos de células rotas, y se usó el sobrenadante para purificar la proteína. Las concentraciones de proteína objetivo totales del sobrenadante se determinaron mediante ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante.

Una columna de 25 ml de resina de afinidad de metal Talon (Clontech, Palo Alto, CA) (preparada como se describe después) se vertió en una columna de vidrio Bio-Rad, de 2,5 cm de diámetro x 10 cm de altura. La columna se rellenó y equilibró por gravedad con 10 volúmenes de columna (CVs) de tampón de equilibración Talon (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0). El sobrenadante se cargó por lotes en resina de afinidad de metal Talon y se sacudió durante la noche. La resina se vertió de vuelta en la columna y se lavó con 10 CVs de tampón de equilibración Talon por gravedad y se eluyó después por gravedad con 140 ml de tampón de elución (tampón de equilibración Talon + imidazol 200 mM-Fluka Chemical). La columna talon se limpió con 5 CVs de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 20 mM pH 5,0 (MES, Sigma) y 5 CVs de H_2O destilada, y se guardó después en etanol del 20%/azida sódica del 0,1%. Se recogieron fracciones de catorce ml durante la cromatografía de elución completa y se leyeron las fracciones con absorbancia a 280 y 320 nm y ensayo de proteína BCA; se guardaron y analizaron también el paso a través y los agrupamientos de lavado. Las fracciones de elución de proteína de interés se agruparon y cargaron directamente en resina de amilosa (New England Biolabs, Beverly, MA).

Para obtener polipéptido de huzalfa11/MBP-6H más puro, las fracciones agrupadas de elución de afinidad de talon se sometieron a resina de amilosa (22 ml) a pH 7,4. Una columna Bio-Rad de 2,5 cm de diámetro x 10 cm de altura se vertió, rellenó y equilibró en 10 CVs de tampón de equilibración de amilosa-Tris 20 mM (JT Baker), NaCl 100 mM (Mallinkrodt), PMSF 1 mM (Sigma), *beta*-mercaptoetanol 10 mM (BME, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) pH 7,4. La muestra se cargó mediante caudal por gravedad de 0,5 ml/min. La columna se lavó por 10 CVs con tampón de equjilibración de amilosa y se eluyó después con ~2 CVs de tampón de equilibración de amilosa + maltosa 10 mM (Fluka Biochemical, Suiza) por gravedad. Se recogieron fracciones de 5 ml durante la cromatografía completa y se leyó la absorbancia a 280 y 320 nm. La columna de amilosa se regeneró con 1 CV de H_2O destilada, 5 CVs de SDS del 0,1% (p/v) (Sigma), 5 CVs de H_2O destilada y después 5 CVS de tampón de equilibración de amilosa.

Las fracciones de interés se agruparon y dializaron en un Slide-A-Lyzer (Pierce) con 4 x 4 l de PBS pH 7,4 (Sigma) para separar contaminantes de bajo peso molecular, intercambio de tampón y desalación. Después de los

cambios de PBS, el material cosechado representaba el polipéptido de huzalfa11/MBP-6H purificado. El polipéptido de huzalfa11/MBP-6H purificado se analizó mediante coloración de Coomassie de SDS-PAGE y análisis de manchas de Western con el anticuerpo conjugado anti-HRP de conejo (Rockland, Gilbertsville, PA). La concentración del polipéptido de huzalfa11/MBP-6H fue 1,92 mg/ml determinado por análisis BCA.

Se preparó polipéptido de huzalfa11/MBP-6H purificado para inyección en conejos y se envió a R & R Research and Development (Stanwood, WA) para producción de anticuerpos. Se inyectaron los conejos para producir antisuero anti-huzalfa11/MBP-6H (siguiente Ejemplo 10).

Ejemplo 10

Anticuerpos policlonales de receptor zalfa11 soluble

Se prepararon anticuerpos policlonales inmunizando dos conejos blancos New Zealand hembras con el polipéptido de huzalfa11/MBP-6H purificado (Ejemplo 9), o el receptor soluble zalfa11CEE recombinante purificado (Ejemplo 6A). Los anticuerpos policlonales correspondientes se denominaron anti-huzalfa11/MBP-6H de conejo y anti-huzalfa11-CEE-BHK de conejo, respectivamente. Se dio a cada conejo una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 200 mg de proteína purifucada en coadyuvante de Freund completo (Pierce, Rockford, IL), seguida por inyecciones IP de refuerzo de 100 mg de proteína purificada en coadyuvante de Freund incompleto cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se sangró a los animales y se recogió el suero. Los conejos fueron después reforzados y sangrados cada tres semanas.

Los anticuerpos policlonales específicos para zalfa11 se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo usando una columna de proteína CNBr-SEPHAROSE 4B (Pharmacia LKB), que se preparó usando 10 mg del polipéptido de huzalfa11/MBP-6H purificado (Ejemplo 9) por gramo de CNBr-SEPHAROSE, seguido por diálisis 20X en PBS durante la noche. Los anticuerpos específicos para zalfa11 se caracterizaron por una comprobación de título ELISA usando 1 mg/ml del antígeno de proteína apropiado como un objetivo del anticuerpo. El límite inferior de detección (LLD) del anticuerpo purificado por afinidad anti-huzalfa11/MBP-6H es una dilución de 500 pg/ml. El LLD del anticuerpo purificado por afinidad anti-huzalfa11-CEE-BHK es una dilución de 50 pg/ml.

Ejemplo 11

Identificación de células que expresan receptor zalfa11 usando RT-PCR

Se aislaron tipos de células humanas específicos y se examinó en ellos la expresión de zalfa11 por RT-PCR. Se aislaron células B de amígdalas humanas recientes por rotura mecánica a través de filtros de células de nylon de 100 μm (Falcon®; Bectin Dickenson, Franklin Lakes, NY). Las suspensiones de células B se enriquecieron en células B CD19+ por selección positiva con una columna magnética VerioMACS VS+ y microperlas CD19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) según instrucciones del fabricante. Se aislaron células T y monocitos de muestras de sangre humana sometida a aféresis, se purificaron células T CD3+ por selección positiva con VarioMACS de microperlas CD3 y se purificaron monocitos por columnas de selección negativa VarioMACS (Miltenyi) según instrucciones del fabricante. Se colorearon muestras de cada población y se analizaron por análisis de clasificación de células de anticuerpos fluorescentes (FACS) (Bectin Dickinson, San Jose, CA) para determinar el enriquecimiento porcentual y los rendimientos resultantes. Las células B CD19+ fueron aproximadamente el 96% purificadas, las células T CD3+ fueron aproximadamente 95% purificadas y los monocitos fueron aproximadamente el 96% purificados.

Se preparó ARN usando un método estándar en la técnica de los tres tipos de células que estaban en reposo o activadas. Se aisló ARN de células en reposo directamente de las anteriores preparaciones de columna. Las células CD19+ y CD3+ se activaron cultivando a razón de 500.000 células/ml en RPMI + 10% de FBS que contenía 5 ng/ml de PMA (Calbiochem, La Jolla, CA) y 0,5 μg/ml de ionomicina (Calbiochem) durante 4 y 24 horas. Los monocitos se activaron cultivando en RPMI + 10% de FBS que contenía 10 ng/ml de LPS (Sigma, St. Louis, MO) y 10 ng/ml de rhIFN-γ (R&D, Minneapolis, MN) durante 24 horas. Se cosecharon células y se lavaron en PBS. Se preparó ARN de los glóbulos de células usando el juego RNeasy Midiprep® (Qiagen, Valencia, CA) según instrucciones del fabricante y se generó síntesis de cADN de primera cadena con el juego Superscript II® (GIBCO BRL, Grand Island, NY) según el método del fabricante.

Se usaron oligos ZC19907 (SEQ ID NO: 38) y ZC19908 (SEQ ID NO: 39) en una reacción PCR para examinar las muestras descritas antes por un fragmento de 1,2 kb correspondiente al mensaje de zalfa11. La multiplicación por PCR se realizó con polimerasa Taq (BRL Grand Island NY), y las condiciones siguientes: 35 ciclos de 95ºC durante 1 min, 60ºC durante 1 min, 72ºC durante 30 s; 1 ciclo a 72ºC durante 10 min; y remojo a 4ºC. Se hicieron pasar 10 μl de cada volumen de reacción de 50 μl sobre un gel IXTAE de agarosa del 2% para identificar los productos resultantes. Los productos de PCR se puntuaron (-) sin producto, (+) banda visible, (++) presencia aumentada de banda y (+++) la banda más predominante, con los resultados mostrados en la siguiente Tabla 5.

TABLA 5

Fuente de cADN	Activación	Producto de PCR
células CD19+	0 h en reposo 4 h activadas 24 h activadas	+ ++ +++
células CD3+	0 h en reposo 4 h activadas 24 horas activadas	- ++ -
monocitos	0 h en reposo 24 h activadas	- -

Los resultados indicaron que el mensaje de zalfa11 está presente en células B CD19+ humanas en reposo y aumenta con activación mitogénica. También parece expresarse por células T CD3+ humanas sólo después de 4 horas de activación. No había mensaje evidente en monocitos humanos en reposo o activados.

Ejemplo 12

Inmunohistoquímica de zalfa11

A. *Preparaciones de células y tejidos*

Los testigos positivos consistían en células BaF3 transfectadas con receptor zalfa11 (Ejemplo 2) y tejidos linfoides de los que se sabe que expresan receptor zalfa11, incluyendo nodo linfático, bazo y timo de ratón recibidos de HSD (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN), nodo linfoide y bazo de mono recibidos de Regional Primate Research Center (Universidad de Washington, Seattle, WA), nodo linfoide y bazo humanos recibidos de CHTN (Cleveland, OH). Los testigos negativos realizados en cada muestra incluían: (1) células BaF3 no transfectadas, (2) tejido de hígado y cerebro de ratón y ser humano del que se sabe que no expresa receptor zalfa11, (3) coloración con tampón de dilución de anticuerpo (Ventann Bioteck Systems, Tucson, AZ) en ausencia de anticuerpo principal y (4) usando proteína de receptor soluble zaqlfa11 en experimentos de competición.

Se examinaron otras muestras de células. Se ensayaron células HL60 no estimuladas y estimuladas. Las células HL60 son un linaje celular promielocítico, que puede diferenciarse en linajes mieloide o de granulocitos con diferentes reactivos. Se prepararon muestras de HL60 estimuladas como sigue: (1) se trataron células HL60 con 10 ng/ml de forbolmiristato-acetato de forbol (PMA) (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 horas para diferenciar en células de linaje de monocitos; y (2) células HL60 tratadas con 1,25% de DMSO (Sigma) durante 4 días para diferenciar en células de tipo neutrófilo. Además, se examinaron células polimorfonucleares humanas (PMN), granulocitos humanos, linfocitos de sangre periférica humana (PBL) y monocitos humanos de sangre humana reciente (preparadas internamente usando métodos rutinarios en la técnica). Las células y tejidos descritos antes se fijaron durante la noche en 10% de NBF (Surgipath, Richmond, IL) y se embebieron en paraplast X-tra (Oxford Scientific, St. Louis, MO) y se seccionaron en 5 μm con un micrómetro Reichart-Jung 2050 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania).

B. *Inmunohistoquímica*

Se desparafinaron rebanadas de tejido, se hidrataron a tampón (agua) y se sometieron a tratamiento HIER con vapor de agua en tampón Antigen Retrieval Citra (BioGenex, San Roman, CA) durante 20 minutos. Se usó suero de cabra normal del 5% (Vector, Burlingame, CA) para bloquear unión no específica durante 10 minutos. Se realizaron análisis de examen inmunocitoquímico usando anticuerpos policlonales para proteína de receptor soluble zalfa11 (anti-huzalfa11-MBP-6H de conejo y anti-huzalfa11-CEE-BHK de conejo; Ejemplo 10) como anticuerpos principales, con diluciones de 1:200 y 1:400 respectivamente. Se usó anti-IgG de conejo, de cabra, conjugado a biotina (Vector; Nº de Cat. BA-1000, 1,5 mg/ml) como anticuerpo secundario con dilución 1:200. En muestras separadas, se realizó competición de proteínas usando proteína de receptor soluble zalfa11CEE adicional (en exceso de 10X veces) (Ejemplo 6A) para el anticuerpo principal para pre-bloquear inmunorreacción del anticuerpo principal. Esta competición se usó como testigo para la especificidad del anticuerpo policlonal de conejo para zalfa11. La detección se realizó en el instrumento Ventana ChemMate 500 usando un juego ChemMate DAB (juego de estreptavidina-biotina marcadas con aplicación de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, y sustrato de DAB) según la instrucción del fabricante y usando el colorante de contraste de hematoxilina del fabricante durante 30 segundos (Ventana Biotek Systems, Tucson, AZ).

Se observó alta expresión de zalfa11 en las células HL60 activadas con PMA. Se observó bajo nivel de expresión en PBL y células HL60 sin estimulación. Un subgrupo de células del bazo, timo y nodo linfático de ratón mostró coloración positiva. El nodo linfático y el bazo de ser humano y ratón, y las células HL60 con estimulación de DM-

SO mostraron coloración mínima o nula. La señal vista en las células y tejidos era competida mayormente usando la proteína de receptor soluble zalfa11 en exceso. Los tejidos testigos negativos de cerebro e hígado no mostraron coloración.

Ejemplo 13

Identificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC's) que expresan receptor zalfa11 usando anti-sueros de conejo policlonal para receptor soluble zalfa11

Se obtuvieron de un donante normal 200 ml de sangre heparinizada reciente. Se diluyó la sangre 1:1 en PBS, y se separó usando un gradiente Ficoll-Paque PLUS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se recogió la interfase de linfocitos. Se lavaron las células 2X en PBS y se resuspendieron en medio RPMI + 5% de FBS con una concentración de 2 x 10^6 células/ml.

Con el fin de determinar si la expresión de receptor zalfa11 es afectada por el estado de activación de las células linfocitos, es decir, entre células en reposo y activadas, se usaron varias condiciones de estimulación: 1) no estimulada, es decir, medio solo (medio RPMI + 5% de FBS); estimulada con 10 ng/ml de PMA + 0,5 μg/ml de ionomicina (ambos de Calbiochem); y 3) activación con PHA (fitohemaglutinina-P, Difco/VWR). Las células se incubaron a 37ºC durante 17 horas y se recogieron después para coloración para detectar la expresión de receptor zalfa11.

Se usó un método de coloración indirecto. Brevemente, las células linfocitos humanos se suspendieron en tampón de coloración (PBS + 0,02% de NaN_3 + 1% de BSA 2% de suero humano normal) y se pusieron en placa a razón de 2 x 10^5 células en 50 μl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se usaron anticuerpos para el receptor soluble zalfa11CEE (Ejemplo 15) para determinar si co-coloreaban con un marcador (CD14) de células B (CD19), células T (CD3) o monocitos en los linfocitos humanos aislados. Se usó como anticuerpo un suero policlonal de conejo para receptor soluble zalfa11 (anti-huzalfa11-CEE-BHK de Rb) (Ejemplo 10) a razón de 10 μg/ml para identificar zalfa11 en los linfocitos. Se usó un anticuerpo secundario, anti-Ig-FITC de conejo, de cabra (Biosource, Camarillo, CA) para visualizar la unión de anticuerpo anti-huzalfa11-CEE-BHK de Rb a los receptores zalfa11. Se usaron simultáneamente otros anticuerpos para colorear células T (CD3-PE; PharMingen, San Diego, CA), células B (CD19-PE) (PharMingen) y monocitos (CD14-PE) (PharMingen) con el fin de identificar co-coloración del anticuerpo anti-receptor zalfa11 en estos tipos de células. Se usaron diversos testigos para determinar unión no específica y niveles de fondo de coloración: (1) se usó un suero policlonal de conejo irrelevante como testigo no específico; y (2) se usó un anticuerpo secundario solo para determinar unión de fondo de ese reactivo. Se usó receptor soluble zalfa11CEE purificado (Ejemplo 6) en un exceso de aproximadamente 10 veces como inhibidor competitivo para verificar la especificidad del anticuerpo anti-huzalfa11-CEE-BHK de conejo para receptor soluble zalfa11.

Después de poner en placa las células y añadir los anticuerpos principal y de co-coloración, se incubaron las células en hielo durante 30 minutos, se lavaron 2X con tampón de coloración y se colorearon con el anticuerpo secundario, anti-Ig-FITC de conejo, de cabra (Biosource), durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células 2X con tampón de coloración y se resuspendieron a razón de 200 μl por pocillo en tampón de coloración que contenía el colorante de viabilidad 7AAD en una concentración final de aproximadamente 1 μg/ml (Sigma, St. Louis, MO). Se leyeron muestras en el FACS-Caliber (Becton-Dickinson, San Jose, CA) y se analizaron células viables.

El policlonal de conejo para receptor zalfa11 coloreó células B en reposo. La señal en células B en reposo fue más brillante que la señal conseguida usando el suero de conejo irrelevante, y la señal disminuyó en mayor extensión en células B que en células T con la adición de receptor soluble zalfa11-CEE en exceso. Este experimento se repitió usando células B y T separadas, y los resultados fueron muy similares. Nuevamente, la coloración con el anticuerpo policlonal de conejo anti-huzalfa11-CEE-BHK para receptor zalfa11 fue más alta en células B en reposo.

Ejemplo 14

Expresión de receptor zalfa11 en diversos tejidos usando RT/PCR cuantitativa en tiempo real

A. *Cebadores y sondas para RT-PCR cuantitativa*

Se ha descrito previamente RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (véase Heid, C.A. *et al., Genome Research* 6: 986-994, 1996; Gibson, U.E.M. *et al., Genome Research* 6: 995-1001, 1996; Sundaresan, S. *et al., Endocrinology* 139: 4756-4764, 1998). Este método incorpora el uso de una sonda específica para el gen que contiene colorantes fluorescentes informador y apagador. Cuando la sonda está intacta, la emisión del colorante informador es negada debida a la estrecha proximidad del colorante apagador. Durante la extensión de PCR usando cebadores directo e inverso específicos para el gen adicionales, la sonda se divide por actividad de nucleasa 5' de polimerasa Taq que libera el colorante informador de la sonda produciendo un aumento de la emisión fluorescente.

Los cebadores y sondas usados para análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de receptor zalfa11 se diseñaron usando el software de diseño de cebadores Primer Express® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores para receptor zalfa11 humano se diseñaron extendiendo una unión intrón-exón para eliminar la multiplicación de ADN genómico. El cebador directo, ZC22,277 (SEQ ID NO: 40) y el cebador inverso, ZC22,276

(SEQ ID NO: 41) se usaron en una reacción PCR (posterior) con una concentración de aproximadamente 300 nM para sintetizar un producto de 143 pb. La sonda TaqMan® de zalfa11 correspondiente, denominada ZG31 (SEQ ID NO: 42) se sintetizó y marcó por PE Applied Biosystems. La sonda ZG31 se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente informador (6-carboxi-fluoresceína) (FAM) (Applied Biosystems) y en el extremo 3' con un colorante fluorescente apagador (6-carboxi-tetrametil-rodamina) (TAMRA) (PE Applied Biosystems).

Como testigo para ensayar la integridad y calidad de las muestras de ARN ensayadas, se examinó el rARN de todas las muestras de ARN (posteriores) usando un cebador y una sonda fijados solicitados a PE Applied Biosystems (Nº de cat. 4304483). El juego contiene un cebador directo de rARN (SEQ ID NO: 43) y el cebador inverso de rARN (SEQ ID NO: 44), sonda TaqMan® de rARN (SEQ ID NO: 45). La sonda de rARN se marcó en el extremo 5' con un colorante fluorescente informador VIC (PE Applied Biosystems) y en el extremo 3' con el colorante fluorescente apagador TAMRA (PE Applied Biosystems). Los resultados de rARN sirven también como testigo interno y permiten la normalización de los resultados de expresión de mARN de zalfa11 vistos en las muestras de ensayo.

Se prepararon muestras de ARN de tipos de células CD3, CD19 y monocitos como se describe en el anterior Ejemplo 11. Se preparó ARN testigo usando el juego RNeasy Miniprep® (Qiagen, Valencia, CA) según instrucciones del fabricante, a partir de aproximadamente 10 millones de células BaF3 que expresan receptor zalfa11 humano (Ejemplo 2A).

B. *RT-PCR cuantitativa en tiempo real*

Se determinaron los niveles relativos de mARN de zalfa11 analizando muestras de ARN total usando el método de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). Se aisló ARN total de células BaF3 que expresan receptor zalfa11 humano por métodos estándares y se usó para generar una curva estándar usada para cuantificación. La curva consistía en diluciones en serie de 10 veces variables desde 2,5-2,5 x 10^{-4} ng/μl para el examen de rARN y 250-0,25 ng/μl para el examen de zalfa11 analizándose por triplicado cada punto de la curva estándar. Se analizaron también por triplicado las muestras de ARN total de las células para niveles de transcripto de receptor zalfa11 humano y para niveles de rARN como testigo endógeno. En un volumen total de 25 μl, cada muestra de ARN se sometió a una reacción RT-PCR de una etapa que contenía: aproximadamente 25 ng de ARN total en tampón A (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM); el colorante patrón interno, carboxi-x-rodamina (ROX); cebadores apropiados (cebadores de rARN aproximadamente 50 nM (SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44) para las muestras de rARN; y cebadores ZC22,277 (SEQ ID NO: 40) y ZC22,276 (SEQ ID NO: 41) aproximadamente 300 nM para muestras de zalfa11); la sonda apropiada (sonda TaqMan® de rARN (SEQ ID NO: 45) aproximadamente 50 nM para muestras de rARN, sonda ZG31 (SEQ ID NO: 42) aproximadamente 100 nM para muestras de zalfa11); $MgCl_2$ 5,5 mM; cada d-CTP, d-ATP y d-GTP 300 μM y d-UTP 600 μM; transcriptasa inversa MuLV (0,25 U/μl); polimerasa de ADN AmpliTaq® Gold (0,025 U/μl) (PE Applied Biosystems); e inhibidor RNasa (0,4 U/μl) (PE Applied Biosystems). Las condiciones de ciclos térmicos de PCR fueron como sigue: una etapa de transcripción inversa (RT) inicial de un ciclo a 48ºC durante 30 minutos; seguida por una etapa de activación con AmpliTaq Gold® (PE Applied Biosystems) de un ciclo a 95ºC durante 10 minutos; seguida por 40 ciclos de multiplicación a 95ºC durante 15 segundos y a 60ºC durante 1 minuto.

Los niveles relativos de ARN de zalfa11 se determinaron usando el método de curva estándar como se describe por el fabricante, PE Biosystems (Boletín del usuario Nº 2: sistema de detección de secuencia ABI Prism 7700, cuantificación relativa de la expresión génica, 11 de Diciembre de 1997). Las mediciones de rARN se usaron para normalizar los niveles de zalfa11 y la muestra de ARN de CD3+ en reposo se usó como calibrador. Se escogió arbitrariamente como calibrador CD3 en reposo y se le dio un valor de 1,00. El resto de las muestras se comparó con relación al calibrador. Los datos se muestran en la siguiente Tabla 6.

TABLA 6

Muestra	En reposo	Estimulación de 4 h	Estimulación de 24 h
CD3	1,00	15,27	16,70
CD19	20,14	65,08	25,42
Monocitos	0,05	sin datos	0,26

Hubo un aumento de 15 veces en la expresión de receptor zalfa11 en CD3+ a las 4 y 24 horas. La CD19 en reposo tenía un aumento de 20 veces en la expresión de receptor con relación a la CD3+ en reposo. Hubo un aumento de 3 veces con una estimulación de 4 horas que volvió a los niveles en reposo en 24 horas. Los monocitos no mostraron expresión detectable de receptor zalfa11 en este ensayo.

C. *Células T, NK y B humanas purificadas como fuente principal usada para valorar expresión de receptor zalfa11 humano*

Se recogió sangre completa (150 ml) de un donante humano sano y se mezcló 1:1 con PBS en tubos cónicos de 50 ml. Treinta ml de sangre diluida se reforzaron después con 15 ml de Ficoll Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Estos gradientes se centrifugaron 30 min a 500 g y se les dejó detenerse sin franar. Las células agotadas de RBC de la interfase (PBMC) se recogieron y lavaron 3 veces con PBS. La producción de PBMC humanas aisladas fue 200 x 10^6 antes de la selección descrita después.

Las PBMCs se suspendieron en 1,5 ml de tampón MACS (PBS, 0,5% de EDTA, EDTA 2 mM) y se pusieron aparte 3 x 10^6 para ARN testigo y para análisis de citometría de flujo. Se añadieron los 0,25 ml de microperlas anti-CD8 humana (Miltenyi Biotec) y se incubó la mezcla durante 15 min a 4 grados C. Estas células marcadas con perlas de CD8 se lavaron con 30 ml de tampón MACS y se resuspendieron después en 2 ml de tampón MACS.

Se preparó una columna VS+ según las instrucciones del fabricante. La columna VS+ se puso después en un campo magnético VarioMACS (Miltenyi). Se equilibró la columna con 5 ml de tampón MACS. Se aplicaron después a la columna las células de ratón primarias aisladas. Se dejaron pasar a su través las células negativas CD8. Se enjuagó la columna con 9 ml (3 x 3 ml) de tampón MACS. Se retiró después la columna del campo magnético y se puso sobre un tubo falcon de 15 ml. Las células CD8+ se eluyeron añadiendo 5 ml de tampón MACS a la columna y las células unidas se sacaron usando el pistón proporcionado por el fabricante. La producción de células T periféricas humanas seleccionadas CD8+ fue 51 x 10^6 células totales. Las células que fluyen a través negativas en CD8 se recogieron, contaron, colorearon con perlas perlas revestidas con anti-CD4 humana y se incubaron después e hicieron pasar sobre una nueva columna VS+ en las mismas concentraciones descritas antes. La producción de células T periféricas humanas seleccionadas CD4+ fue 42 x 10^6 células totales.

Una muestra de cada una de las células T humanas seleccionadas CD8+ y CD4+ se separó para coloración y clasificación en un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) para valorar su pureza. Se usaron un anticuerpo anti-CD4 humana conjugado con PE, un Ab anti-CD8-FITC humana y un Ab anti-CD19-CyChrome humana (todos de Pharmingen) para colorear las células seleccionadas CD8+ y CD4+. Las células seleccionadas por CD8 en este primer experimento fueron 80% de CD8+, y las células seleccionadas por CD4 fueron 85% de CD4+. En 2 experimentos subsiguientes (Ejemplo 14B), las células purificadas CD8+ fueron del 84% y 81% de pureza, y las células CD4+ fueron del 85% y 97% de pureza, respectivamente. En un experimento, se colorearon las células que no se unen (fluyen a través) con perlas revestidas con anti-CD19 humana (Miltenyi) y se hicieron pasar sobre una tercera columna de perlas magnéticas para aislar células CD19+ B (éstas eran del 92% de pureza).

Las células seleccionadas CD8+,CD4+ y CD19+ humanas se activaron incubando 0,5 x 10^6 células/ml en RPMI + 5% de ultrasuero humano (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) + 10 ng/ml de PMA y 0,5 μg/ml de ionomicina (Calbiochem) durante 4, 16 o 24 horas a 37ºC. Las células T (2,5 x 10^6/pocillo) se estimularon alternativamente en placas de 24 pocillos pre-revestidas durante la noche con 0,5 μg/ml de mAb UCHT1 anti-CD3 unido a placa (PharMingen) con o sin mAb anti-CD28 soluble a razón de 5 μg/ml. En cada punto de tiempo, las células se cosecharon, globulizaron, lavaron una vez con PBS y globulizaron de nuevo. Se separó el sobrenadante y los glóbulos se congelaron rápidamente en un baño de hielo/etanol, y se guardaron después a -80ºC para preparación de ARN en una fecha posterior.

En un experimento separado, se enriquecieron células NK humanas a partir de Ficolled PBMC por selección negativa usando el sistema de enriquecimiento de NK humanas (consistente en anticuerpos para CD3, CD4, CD14, CD19, CD66b y glicoforina A) de Stem Cell Technologies (Vancouver, B.C., Canadá). Se prepararon glóbulos de células a partir de células NK aisladas recientemente de 2 donantes diferentes, o de células NK cultivadas 24 horas en medio sólo o en medio suplementado con 20 ng/ml de IL-15. Se ensayó también ARN de un linaje celular NK humano de un linfoma no de Hodgkin maligno y denominado NK-92 (ATCC Nº CRL-2407). Como testigos positivos, se aisló ARN de los linajes celulares B humanos CESS (ATCC Nº TIB-190), IM-9 (ATCC Nº CCL-159) y HS-Sultan (CRL-1484).

Se realizó PCR en tiempo real en estas células seleccionadas humanas NK, CD8+, CD4+ y CD19+ como se ha descrito antes para valorar la expresión de receptor zalfa11 humano. Los niveles relativos de ARN de receptor zalfa11 se determinaron por análisis de muestras de ARN total usando el método de RT-PCR de una etapa (PE Applied Biosystems). Se usó ARN de células BaF3 que expresan receptor zalfa11 humano para generar testigo apropiado para curvas estándares para la PCR en tiempo real descrita en el anterior Ejemplo 14C. Los resultados de los experimentos que analizan la expresión del Ligando de zalfa11 y el receptor zalfa en células estimuladas y no estimuladas son como se describe en el siguiente Ejemplo 14D-E.

D. *Expresión de receptor y ligando de zalfa11 humano en células CD4+, CD8+ y CD19+*

El primer experimento usó RT-PCR, descrita antes, para valorar la expresión de receptor zalfa11 en muestras de CD4+ y CD8+ no estimuladas y estimuladas anti-CD3 en los puntos de tiempo de 0 h (células no estimuladas ("en reposo")) y a las 4 h, 15,5 h y 24 h después de la estimulación. La muestra de CD4+ en reposo se escogió arbitrariamente como calibrador y se le da un valor de 1,00. Había aproximadamente un aumento de 4 veces en la expresión de receptor en células CD4+ no estimuladas de 4 h a 24 h de cultivo y un aumento de aproximadamente 8 veces durante el mismo período de tiempo en células CD4+ estimuladas anti-CD3. Las células CD8+ mostraron un

aumento de 7 veces de la expresión de receptor zalfa11 que alcanzó un pico a las 4 h y disminuyó con el tiempo. Con estimulación anti-CD3, las células CD8+ tenían un aumento constante de 8 veces de la expresión de receptor.

El segundo experimento usó RT-PCR para valorar expresión de receptor zalfa11 en muestras de CD4+ y CD8+ estimuladas anti-CD3, estimuladas con PMA + ionomicina y no estimuladas en los puntos de tiempo de 0 h y a las 3,5 h, 16 h y 24 h después de la activación. La muestra de CD8+ en reposo se escogió arbitrariamente como calibrador y se le da un valor de 1,00. Las células CD4+ y CD8+ en reposo no tenían magnitudes significativas de expresión de receptor. La expresión fue aproximadamente 3 veces más alta en las muestras de CD4+ estimuladas con PMA + ionomicina a las 3,5 h, 16 h y 24 h después de la estimulación. La expresión en células CD4+ activadas anti-CD3 alcanzó un pico de 10 veces sobre los niveles de fondo a las 3,5 h después de la estimulación, y volvió después a niveles de 4 veces sobre el fondo a las 16 h después de la estimulación. Las células CD8+ mostraron un aumento de expresión de 4 veces a las 3,5 h después de la estimulación con PMA + ionomicina, disminuyendo la expresión en puntos de tiempo subsiguientes. Como en el primer experimento, las células CD8+ estimuladas anti-CD3 presentaban nuevamente una inducción de la expresión de receptor de 8 veces sobre el fondo.

El experimento final usó RT-PCR para valorar expresión de receptor zalfa11 en muestras de CD4+ y CD8+ estimuladas anti-CD3 y anti-CD3/anti-CD28 y no estimuladas en los puntos de tiempo de 0 h, y a las 2 h, 4 h y 16 h después de la estimulación. Se examinó también la expresión de receptor en los mismos intervalos de tiempo de células CD19+ activadas con PMA + ionomicina. La muestra de CD4+ en reposo se escogió arbitrariamente como calibrador y se le da un valor de 1,00. Las células CD4+ estimuladas anti-CD3 a las 2 h sólo tenían una inducción de 4 veces de receptor, en comparación con la inducción de 10 veces vista a las 3,5 h en el experimento previo. La combinación de anti-CD3 y anti-CD8 aumentó la expresión a 8 veces sobre el fondo. Las células CD8+ estimuladas anti-CD3/anti-CD28 de 16 h tenían niveles de expresión de receptor muy bajos, como se ve en las células CD8+ en experimentos previos (anteriormente). Las células CD19+ estimuladas con PMA + ionomicina tenían la expresión de receptor más significativa con un aumento de 19 veces a las 2 h, pero los niveles de expresión disminuyeron de vuelta a los de células en reposo en 16 h.

Se esperaba una cierta magnitud de variación entre tomas de sangre (es decir, muestras múltiples en diferentes momentos del mismo paciente y entre pacientes múltiples). Por tanto, se analizaron tendencias de datos dentro de cada estudio o de una muestra simple de sangre, y los tres experimentos anteriores se compararon para obtener una conclusión global. La tendencia de los experimentos de PCR en tiempo real descritos antes es que de todos los tipos de células ensayados, las células B CD19+ activadas con PMA + ionomicina expresaban los niveles más altos de ARN de receptor zalfa11. Las células CD4+ y CD8+ también pueden estimularse para expresar receptor, pero a niveles más bajos que en células B.

E. *Expresión de receptor zalfa11 humano en células NK humanas*

Se realizó también PCR en tiempo real en células NK humanas, purificadas como se ha descrito antes en el Ejemplo 14C. La muestra NK-92 se escogió arbitrariamente como calibrador y se le da un valor de 1,00. Hubo aproximadamente un aumento de 4,5 veces de la expresión de receptor en las células CESS testigo positivo, un aumento de 1,5 veces en células IM-9 y no hubo aumento en las células HS-Sultan (0,9 veces con relación a NK-92). Las células NK, recientes o cultivadas durante la noche con o sin IL-15, expresaban niveles muy similares de receptor zalfa11 como NK-92 (con valores variables de 0,9-1,2 veces diferentes con relación a NK-92).

Ejemplo 15

Identificación de células que expresan receptor zalfa11 usando hibridación in situ

Se aislaron tejidos humanos específicos y se examinó su expresión de zalfa11 por hibridación *in situ*. Los diversos tejidos humanos preparados, seccionados y sometidos a hibridación *in situ* incluían timo, bazo, amígdala, nodo linfoide y pulmón. Los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10% y se bloquearon en parafina usando técnicas estándares. Los tejidos se seccionaron en 4 a 8 micrómetros. Se prepararon los tejidos usando un método estándar ("Development of non-isotopic *in situ* hybridization" en http://dir.niehs.nih.gov//dirlep/ish.html). Brevemente, se desparafinaron secciones de tejido con HistoClear (National Diagnostics, Atlanta, GA) y se deshidrataron después con etanol. A continuación, se digirieron con Proteinasa K (50 μg/ml) (Boehringer Diagnostics, Indianapolis, IN) a 37ºC durante 2 a 20 minutos. Se siguió a esta etapa con acetilación y re-hidratación de los tejidos.

Se diseñaron dos sondas *in situ* generadas por PCR contra la secuencia de zalfa11 humano. Se diseñaron dos grupos de oligos para generar sondas para regiones separadas del cADN de zalfa11: (1) los oligos ZC23,684 (SEQ ID NO: 60) y ZC23,656 (SEQ ID NO: 61) se usaron para generar una sonda de 413 pb para zalfa11; y (2) los oligos ZC23,685 (SEQ ID NO: 62) y ZC23,657 (SEQ ID NO: 63) se usaron para generar una sonda de 430 pb para zalfa11. La segunda sonda está a 1500 pb 3' de la primera sonda de zalfa11. El oligo antisentido de cada grupo contenía también la secuencia de trabajo para el promotor de polimerasa de ARN T7 para permitir una transcripción fácil de sondas ARN antisentido de estos productos de PCR. Las condiciones de reacción PCR fueron como sigue: 30 ciclos a 94ºC durante 30 s, 60ºC durante 1 min, 72ºC durante 1,5 min. Los productos de PCR se purificaron mediante columnas de centrifugación Qiagen seguidas por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Las sondas se marcaron a continuación con digoxigenina (Boehringer) o biotina (Boehringer) usando un sistema de transcripción *in vitro* (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante.

La hibridación *in situ* se realizó con una sonda de zalfa11 marcada con digoxigenina o biotina (anterior). Se añadió la sonda a las platinas con una concentración de 1 a 5 pmoles/ml durante 12 a 16 horas a 55-60ºC. Las platinas se lavaron seguidamente en 2X SSC y 0,1X SSC a 50ºC. Las señales se multiplicaron usando multiplicación de señal con tiramida (TSA) (TSA, juego indirecto *in situ*; NEN) y se visualizaron con juego de sustrato Vector Red (Vector Lab) según instrucciones del fabricante. Las platinas se colorearon-contaron después con hematoxilina (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Se vio una señal en el timo, amígdala, pulmón y nodo linfático. Las células de coloración positiva parecían ser linfocitos.

Ejemplo 16

Ensayo de trampa de secreción

Se usó un ensayo de trampa de secreción para identificar el cADN para el Ligando de zalfa11. Los agrupamientos de ADN positivos obtenidos del empeño de clonación de expresión se describieron en la Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217.

Se puso en el ensayo de proliferación medio acondicionado de clones de ADN transfectados en células BHK en formato de 96 pocillos, usando células BaF3/zalfa11 descritas en el Ejemplo 2. Varios agrupamientos de ADN dieron actividades positivas que se repitieron y neutralizaron con receptores solubles zalfa11 (Ejemplo 6). Un agrupamiento de ADN positivo se transfectó en células COS en formato de 12 pocillos, usando el método con Lipofectamine® descrito después.

Se realizó después un ensayo de trampa de secreción usando receptores solubles zalfa11 (Glu-Glu C-terminal etiquetado con o sin biotinación; etiquetado Flag C-terminal; o fusiones de receptores solubles Fc4 zalfa11) (Ejemplo 6) para ensayar la unión directa entre el Ligando de zalfa11 del agrupamiento positivo y receptores solubles zalfa11 (véase después). El resultado fue positivo, permitiendo la detección y el aislamiento de clones que expresan el Ligando de zalfa11. Se sacudieron placas a 37ºC durante 24 horas, y se prepararon después minipreps de ADN (QiaPrep® 96 Turbo Miniprep Kit; Qiagen) en formato de 96 pocillos usando un TomTech Quadra 9600. Se agrupó después el ADN plásmido en el formato de filas y columnas, se transfectó en células COS y se determinaron después los agrupamientos positivos por trampa de secreción como se describe después.

Transfecciones de células COS

La transfección de células COS se realizó como sigue: se mezclan 3 μl de ADN agrupado y 5 μl de Lipofectamine® en 92 μl de medio DMEM exento de suero (55 mg de piruvato sódico, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1 μg de selenio y 5 mg de fetuína en 500 ml de DMEM), se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos y se añaden después 400 μl de medio DMEM exento de suero. Se añade esta mezcla de 500 μl a 1,5 x 10^5 células COS/pocillo puestas en placa de cultivo de tejidos de 12 pocillos y se incuban durante 5 horas a 37ºC. Se añaden 500 μl de medio FBS DMEM al 20% (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) y se incuba durante la noche.

Ensayo de trampa de secreción

La trampa de secreción se realizó como sigue: se enjuagó medio de células con PBS y se fijó después durante 15 minutos con 1,8% de formaldehído en PBS. Se lavaron después las células con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y 0,05% de Tween-20 en H_2O), y se permearon con 0,1% de Triton-X en PBS durante 15 minutos y se lavaron de nuevo con TNT. Se bloquearon las células durante 1 hora con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y 0,5% de reactivo de bloqueo (NEN Renaissance TSA-Direct Kit) en H_2O), y se lavaron de nuevo con TNT. Si se usaba la proteína biotinada, las células se bloquearon durante incubaciones de 15 minutos con avidina y después biotina (Vector Labs), lavando entre ellas con TNT. Dependiendo de qué receptor soluble se usó, las células se incubaron durante 1 hora con: (A) 1-3 μg/ml de proteína de fusión zalfa11-Fc4 de receptor soluble zalfa11 (Ejemplo 6); (B) 3 μg/ml de receptor soluble zalfa11 etiquetado FLAG C-terminal, zalfa11CFLG (Ejemplo 6); (C) 3 μg/ml de receptor soluble zalfa11 etiquetado GluGlu C-terminal, zalfa11CEE (Ejemplo 6); o (D) 3 μg/ml de receptor soluble zalfa11 biotinado zalfa11CEE (Ejemplo 6) en TNB. Se lavaron después las células con TNT. Dependiendo de qué receptor soluble se usó, se incubaron las células durante otra hora con: (A) anti-Ig humana-HRP de cabra diluido 1:200 (específico para Fc); (B) M2-HRP diluido 1:1000; (C) anticuerpo anti-GluGlu-HRP diluido 1:1000; o (D) estreptavidina-HRP diluida 1:300 (juego NEN) en TNB. Se lavaron nuevamente las células con TNT.

Se detectó unión positiva con reactivo de fluoresceína tiramida diluido 1:50 en tampón de dilución (juego NEN) y se incubó durante 4-6 minutos, y se lavó con TNT. Se conservaron las células con Vectashield Mounting Media (Vector Labs Burlingame, CA) diluido 1:5 en TNT. Se visualizaron las células usando un filtro FITC en microscopio fluorescente.

Ejemplo 17

Ligando de zalfa11 de ratón se une a receptor soluble zalfa11 humano en ensayo de trampa de secreción

Un plásmido que contiene ADN que codifica el Ligando de zalfa11 de ratón (SEQ ID NO: 47) se transfectó en células COS, y se ensayó la unión de receptor soluble zalfa11 humano zalfa11-Fc4 (Ejemplo 6C) a las células COS transfectadas mediante un ensayo de trampa de secreción (Ejemplo 16). El ensayo confirmó que el Ligando de zalfa11 de ratón se une a receptor soluble zalfa11 humano.

La transfección de células COS se realizó según el Ejemplo 16 usando 0,7 μg del plásmido en 3 μl. La trampa de secreción se realizó según el Ejemplo 16 usando 1 μg/ml de proteína de fusión receptor soluble zalfa11 Fc4 (Ejemplo 6C) en TNB, y anti-Ig humana-HRP de cabra diluido 1:200 (específico para Fc) en TNB para el anticuerpo detectable. Se detectó la unión positiva del receptor zalfa11 humano soluble a las células fijadas preparadas con reactivo de fluoresceína tiramida, se conservó y visualizó según el Ejemplo 16. El resultado positivo indicó que el Ligando de zalfa11 de ratón se une a receptor soluble zalfa11 humano.

Ejemplo 18

Ligando de zalfa11 de ratón activa receptor zalfa11 humano en ensayo de BaF3 usando Alamar Blue

Se centrifugaron células BaF/zalfa11, se lavaron y se pusieron en placa en medio exento de mIL-3 como se describe en el Ejemplo 2. La proliferación de las células BaF3/zalfa11 se valoró usando medio acondicionado exento de suero de células BHK que expresan Ligando de zalfa11 de ratón (SEQ ID NO: 47). El medio acondicionado se diluyó con medio exento de mIL-3 a concentraciones del: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, o,75% y 0,375%. El ensayo de proliferación se realizó como en el Ejemplo 2. Los resultados confirmaron la respuesta proliferativa de las células BaF3/zalfa11 a Ligando de zalfa11 de ratón. La respuesta, según se midió, era aproximadamente de 5 veces sobre el fondo con la concentración del 50%.

Ejemplo 19

Ligando de zalfa11 activa receptor zalfa11 humano en ensayo de luciferasa

A. *Construcción de linaje celular BaF3/KZ134/zalfa11*

El plásmido KZ134 se construyó con los oligonucleótidos complementarios ZC12,749 (SEQ ID NO: 48) y ZC12,748 (SEQ ID NO: 49) que contienen elementos de unión de factor de transcripción STAT de 4 genes. Un elemento inducible c-fos Sis modificado (m67SIE o hSIE) (Sadowski, H. *et al., Science* 261: 1739-1744, 1993), el p21 SIE1 del gen de p21 WAF1 (Chin, Y. *et al., Science* 272: 719-722, 1996), el elemento de respuesta de la glándula mamaria del gen de β-caseína (Schmitt-Ney, M. *et al., Mol. Cell Biol.* 11: 3745-3755, 1991) y un elemento inducible STAT del gen de Fcg RI (Seidel, H. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3041-3045, 1995). Estos oligonucleótidos contienen extremos compatibles Asp718-XhoI y se ligaron, usando métodos estándares, en un vector informador de luciderasa de luciérnaga receptor con un promotor c-fos (Poulsen, L.K. *et al., J. Biol. Chem.* 273: 6229-6232, 1998) digerido con las mismas enzimas y que contiene un marcador seleccionable de neomicina. El plásmido KZ134 se usó para transfectar establemente células BaF3, usando métodos de transfección y selección estándares, para hacer el linaje celular BaF3/KZ134.

Un linaje celular indicador BaF3/KZ134 estable, que expresa el receptor zalfa11 de longitud completa, se construyó según el Ejemplo 1, usando aproximadamente 30 μg del vector de expresión de zalfa11. Se diluyeron clones, se pusieron en placa y se seleccionaron usando técnicas estándares. Se examinaron clones por el ensayo de luciferasa (véase siguiente Ejemplo 19B) usando como inductor el medio acondicionado de Ligando de zalfa11 humano. Se seleccionaron clones con la más alta respuesta de luciferasa (mediante luciferasa de STAT) y el menor fondo. Se seleccionó un linaje celular transfectante estable. Se denominó al linaje celular BaF3/KZ134/zalfa11.

B. *Ligando de zalfa11 humano y de ratón activa receptor zalfa11 humano en ensayo de luciderasa de BaF3/KZ134/zalfa11*

Se centrifugaron células BaF3/KZ134/zalfa11 y se lavaron en medio exento de mIL-3. Las células se centrifugaron y lavaron 3 veces para asegurar la separación de mIL-3. Se contaron después las células en un hemacitómetro. Se pusieron en placa las células en un formato de 96 pocillos a razón de aproximadamente 30.000 células por pocillo en un volumen de 100 μl por pocillo usando el medio exento de mIL-3. Se usó el mismo procedimiento para células BaF3/KZ134 no transfectadas de uso como testigo en el ensayo subsiguiente.

La activación de STAT de las células BaF3/KZ134/zalfa11 se valoró usando medio acondicionado de (1) células BHK570 transfectadas con un vector de expresión que codifica el Ligando de zalfa11 humano (SEQ ID NO: 19) o (2) células BHK570 transfectadas con un vector de expresión que codifica el Ligando de zalfa11 de ratón (SEQ ID NO: 47) o (3) medio exento de mIL-3 para medir la respuesta testigo de medio sólo. El medio acondicionado se diluyó con medio RPMI exento de mIL-3 hasta concentraciones 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,5%, 0,75% y 0,375%. Se añadieron 100 μl del medio acondicionado diluido a las células BaF3/KZ134/zalfa11. El ensayo usando el medio

acondicionado se hizo en paralelo sobre células BaF3/KZ134 no transfectadas como testigo. El volumen de ensayo total fue 200 μl. Las placas de ensayo se incubaron a 37ºC y 5% de CO_2 durante 24 horas, en cuyo momento se globulizaron las células por centrifugación a 2.000 rpm durante 10 minutos, se aspiró el medio y se añadieron 25 μl de tampón de lisis (Promega). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se midió en las placas la activación de la construcción informadora de STAT leyéndolas en un luminómetro (Labsystems Luminoskan, modelo RS) con 40 μl añadidos de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) en una integración de cinco segundos.

Los resultados confirmaron la respuesta del informador de STAT de las células BaF3/KZ134/zalfa11 al Ligando de zalfa11 humano. La respuesta, según se midió, era aproximadamente de 50 veces sobre el testigo con sólo medio a la concentración del 50%. La activación de STAT en respuesta a Ligando de zalfa11 humano estaba ausente en las células testigo BaF3/KZ134 no transfectadas, mostrando que la respuesta es mediada a través del receptor zalfa11.

Los resultados confirmaron también la respuesta del informador de STAT de las células BaF3/KZ134/zalfa11 al Ligando de zalfa11 de ratón. La respuesta, según se midió, era aproximadamente de 40 veces sobre el testigo con sólo medio a la concentración del 50%. Además, la activación de STAT en respuesta a Ligando de zalfa11 de ratón era evidente (aproximadamente 5 veces) en las células testigo BaF/KZ134 no transfectadas, sugiriendo que las células BaF3 de ratón pueden tener receptor de ratón endógeno.

Ejemplo 20

Ligando de zalfa11 de ratón es activo en ensayo de médula ósea de ratón

A. *Aislamiento de células de médula de baja densidad no adherentes*

Se obtuvo aspirado de fémur de ratón reciente (médula) de ratones Balb/C o C57BL/6 machos de 6-10 semanas de edad. Se lavó después la médula con RPMI + 10% de FBS (JRH, Leneka KS; Hyclone, Logan UT) y se suspendió en RPMI + 10% de FBS como una suspensión de células de médula completa. La suspensión de células de médula completa se sometió después a un gradiente de densidad (Nycoprep, 1.077, Animal; Gibco BRL) para enriquecer en células de baja densidad, mayormente mononucleares, como sigue: la suspensión de células de médula completa (aproximadamente 8 ml) se pipeteó cuidadosamente en la parte superior de aproximadamente 5 ml de solución de gradiente Nycoprep en un tubo cónico de 15 ml, y se centrifugó después a 600 x g durante 20 minutos. Se separó después la capa de interfase, que contenía las células mononucleares de baja densidad, se lavó con RPMI + 10% de FBS en exceso, y se globulizó por centrifugación a 400 x g durante 5-10 minutos. Este glóbulo se resuspendió en RPMI + 10% de FBS y se puso en placa en un matraz T-75 a razón de aproximadamente 10^6 células/ml, y se incubó a 37ºC y 5% de CO_2 durante aproximadamente 2 horas. Las células resultantes en suspensión eran células de médula no adherentes de baja densidad (NALD).

B. *Ensayo en 96 pocillos*

Las células de médula de ratón NALD se pusieron en placa a razón de 25.000 a 45.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos en RPMI + 10% de FBS + 1 ng/ml de factor de células estaminales de ratón (mSCF) (R & D Systems, Minneapolis, MN) más 5% de medio acondicionado de uno de los siguientes: (1) células BHK 570 que expresan Ligando de zalfa11 de ratón (SEQ ID NO: 47), (2) células BHK 570 que expresan Ligando de zalfa11 humano (SEQ ID NO: 10) o (3) células BHK 570 testigo que contienen vector y no expresan ningún Ligando. Estas células se sometieron después a una variedad de tratamientos con citoquina para ensayar expansión o diferenciación de células hematopoyéticas de la médula. Para ensayar, las células de médula de ratón NA LD en placa se sometieron a interleuquina-15 humana (hIL-15) (R&D Systems) o una de un panel de otras citoquinas (R&D Systems). Se ensayó dilución en serie de hIL-15 o las otras citoquinas, con dilución en serie de 2 veces desde una concentración de aproximadamente 50 ng/ml hasta aproximadamente 6025 ng/ml. Después de 8 a 12 días, se puntuó la proliferación de células de los ensayos en 96 pocillos por ensayo azul Alamar como se describe en el Ejemplo 2.

C. *Resultados del ensayo de médula de ratón NA LD en 96 pocillos*

El medio acondicionado de las células BHK que expresan Ligando de zalfa11 de ratón y humano actuó en sinergia con hIL-15 para promover la expansión de una población de células hematopoyéticas en la médula de ratón NA LD. Esta expansión de células hematopoyéticas no se mostró con medio acondicionado de BHK testigo más IL-15. La población de células hematopoyéticas expandida por el Ligando de zalfa11 de ratón con hIL-15 y las células hematopoyéticas expandidas por el Ligando de zalfa11 humano con hIL-15 se propagaron adicionalmente en cultivo de células. Estas células hematopoyéticas se colorearon con un anticuerpo de células NK anti-Pan marcado con ficoeritrina (Pharmingen) y se sometieron a análisis de citometría de flujo, lo que demostró que las células expandidas se coloreaban positivamente por este marcador de células destructoras naturales (NK).

Se realizó el mismo ensayo con 96 pocillos usando células de médula humana recientes compradas a Poietic Technologies, Gaithersburg, MD. De nuevo, conjuntamente con IL-15, el Ligando de zalfa11 de ratón y humano expandió una población de células hematopoyéticas que se colorearon positivamente por el marcador de células NK usando el anticuerpo descrito antes.

El receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, puede usarse en este ensayo para medir los efectos de unión, antagonista o inhibidor del receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, sobre el Ligando de zalfa11.

Ejemplo 21

Purificación de receptor zalfa11-MBP

Salvo indicación en contrario, todas las operaciones se realizaron a 4ºC. Se usó el siguiente procedimiento para purificar fusiones de receptor soluble zalfa11-MBP humano (o de ratón) de *E. coli* (Ejemplo 8). Se descongeló pasta de *E. coli* congelada pre-centrifugada y se diluyó en 2 litros de tampón B (TRIS 0,02 M (EM Science); NaCl 0,2 M (Mallincrodt); 2-mercaptoetanol 0,01 M (EM Science); pH 8,0; con 5 mg/l de pepstatina A (Boehringer Mannheim); 5 mg/l de aprotinina (Boehringer Mannheim); y 1 mg/l de PMSF (Fluka)) más 1-2 ml de un reactivo anti-espumación antiespuma AF289 (Sigma). La mezcla se elaboró en un rompedor de células de prensa francesa pre-enfriado (Constant Systems LTD) con 1.400-2.100 kg/cm^2.

El lisado se centrifugó después a 18.000 x g durante 45 minutos a 4ºC y se retuvo el sobrenadante. Se añadió al sobrenadante de lisado una suspensión de 200 ml de resina Amylose (New England BioLabs), pre-equilibrada en tampón A (TRIS 0,02 M (EM Science); NaCl 0,2 M (Mallincrodt); 2-mercaptoetanol 0,01 M (EM Science); pH 8,0) y se incubó durante la noche en 21 botellas rodantes para permitir una absorción máxima del lote de la proteína de fusión de MBP. Se lavó la resina en formato de columna por lotes por $\geq$ 5 volúmenes de columna con tampón A, y se eluyó después el lote con tampón C (tampón A con maltosa 0,02 M (Sigma)). Se recogieron fracciones crudas y se comprobaron por absorbancia a 280 nm.

La proteína eluída se analizó por coloración SDS NuPAGE (NOVEX) Coomassie (Sigma). La muestra y la proteína en bloque se guardaron a -80ºC.

Ejemplo 22

Actividad de células expandidas de Ligando de zalfa11 humano y de ratón y células NK de ratón maduras en ensayos de citotoxicidad de células NK

A. *Ensayo de células NK*

Se examinó la citólisis del objetivo mediada por células NK mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Las células objetivo (células K562 (ATCC Nº CCL-243) en ensayos humanos y células YAC-1 (ATCC Nº TIB-160) en ensayos de ratón) carecen de expresión de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (MHC), haciéndolas susceptibles a lisis mediada por células NK. Un linaje celular objetivo testigo negativo en ensayos de ratón es el timoma de MHC$^+$ EL4 (ATCC Nº TIB-39). Se hicieron crecer células K562, EL4 y YAC-1 en medio RP10 (RPMI 1640 estándar (Gibco/BRL, Grand Island, NY) suplementado con 10% de FBS (Hyclone, Logan, UT) así como glutamina 4 mM (Gibco/BRL), 100 UI/ml de penicilina + 100 MCG/ml de estreptomicina (Gibco/BRL), β-mercaptoetanol 50 μM (Gibco/BRL) y tampón HEPES 10 mM (Gibco/BRL). El día del ensayo, se cosecharon 1-2 x 10^6 células objetivo y se resuspendieron a razón de 2,5-5 x 10^6 células/ml en medio RP10. Se añadieron directamente a las células 50-100 μl de ^{51}Cr-cromato sódico de 5 mCi/ml (NEN, Boston, MA) y se las incubó durante 1 hora a 37ºC, se las lavó después dos veces con 12 ml de PBS y se las resuspendió en 2 ml de medio RP10. Después de contar las células en un hemacitómetro, se diluyeron las células objetivo a 0,5-1 x 10^5 células/ml y se mezclaron 100 μl (0,5-1 x 10^4 células) con células efectoras como se describe después.

En ensayos humanos, se prepararon células efectoras a partir de células CD34$^+$ BM humanas seleccionadas y expandidas que se cosecharon, lavaron, contaron, mezclaron en diversas concentraciones con células objetivo marcadas con ^{51}Cr en placas de fondo redondo de 96 pocillos, y se incubaron durante 4 horas a 37ºC. Después de co-incubar las células efectoras y las células objetivo marcadas, se recogió la mitad del sobrenadante de cada pocillo y se contó en un contador gamma durante 1 min/muestra. El porcentaje de liberación especifica de ^{51}Cr se calculó a partir de la fórmula 100 x (X-Y)/(Z-Y), en la que X es liberación de ^{51}Cr en presencia de células efectoras, Y es la liberación espontánea en ausencia de efectoras y Z es la liberación de ^{51}Cr total de células objetivo incubadas con 0,5% de Triton X-100. Los datos se representaron como % de lisis específica frente a la relación efectora a objetivo en cada pocillo.

B. *Actividad de células expandidas de Ligando de zalfa11 humano*

Se cultivaron HPCs humanos CD34+ aislados con flt3 +/-Ligando de zalfa11 y flt3 +IL-15 +/-Ligando de zalfa11, se cosecharon las células el día 15 para valorar su capacidad para lisar células MHC$^-$ K562 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar como se ha descrito antes y para analizar su fenotipo superficial por citometría de flujo. Como era de esperar de informes previos (Mrozek, E *et al., Blood* 87: 2632-2640, 1996; y Yu, H *et al., Blood* 92: 3647-3657, 1998), la adición simultánea de IL-15 y flt3L indujo el resultado de una pequeña población de células CD56$^+$. De modo interesante, aunque las células BM cultivadas simultáneamente con Ligando de zalfa11 y flt3L no se expandieron significativamente, hubo un aumento significativo del número de células totales en cultivos que contenían una combinación de flt3L, Ligando de zalfa11 e IL-15.

Para una valoración del fenotipo superficial de estos cultivos de BM humanas, se colorearon pequeñas partes alícuotas de las células para análisis citométrico de flujo de 3 colores con mAbs anti-CD3-FITC, anti-CD56-PE y anti-CD16-CyChrome (todos de PharMingen, San Diego, CA) y se las analizó en un FACSCalibur usando software CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Este análisis citométrico de flujo confirmó que las células producidas de estos cultivos eran células NK diferenciadas, porque eran grandes y granulares y expresaban CD56 y CD16, y eran $CD3^-$ (Lanier, LL *Annu. Rev. Immunol*. 16: 359-393, 1998). Además, estas células presentaban una función efectora significativamente más alta que las células desarrolladas con IL-15 y flt3. Más específicamente, las células desarrolladas en las tres citoquinas lisaban más del 40% de los objetivos K562 en una relación efectora a objetivo (E:T) de 1,5, mientras que las células desarrolladas en IL-15+flt3L lisaban menos del 5% de los objetivos en una E:T de 2. Estos datos demuestran que, en combinación con IL-15, el Ligando de zalfa11 (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) estimula la diferenciación de células NK a partir de células $CD34^+$ BM.

C. *Actividad de células expandidas de Ligando de zalfa11 de ratón*

Para ensayar los efectos de Ligando de zalfa11 de ratón (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) en células progenitoras hematopoyéticas de ratón, se expandieron células de médula ósea Linaje-negativas (Lin-) purificadas de ratones C57Bl/6 en flt3+IL-15+/-Ligando de zalfa11. El día 6 de cultivo, las células ("efectoras") se cosecharon y contaron, y se resuspendieron después en 0,4 ml de medio RP10 (Ejemplo 22A). Dos partes alícuotas (0,15 ml cada una) de cada muestra expandida con o sin Ligando de zalfa11 (Ejemplo 22A) se diluyeron en serie 3 veces por duplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos, para un total de 6 pocillos de 100 μl cada uno. Los restantes 100 μl de células se colorearon para marcadores superficiales de células NK con mAbs FITC-anti-2B4 y PE-anti-DX5 (PharMingen) y se analizaron por citometría de flujo. Cada grupo de células expuestas a flt3+IL-15 con o sin la presencia de Ligando de zalfa11 de ratón tuvo fracciones similares de células 2B4+DX5+, variando del 65 al 75% positivo para ambos marcadores de NK.

Para el ensayo de lisis de NK, se marcaron células objetivo (YAC-1 y EL4) con ^{51}Cr como se ha descrito antes. Después de contar las células objetivo en un hemacitómetro, las células objetivo se diluyeron hasta 0,5-1 x 10^5 células/ml y se mezclaron 100 μl de YAC-1 o EL4 (0,5-1 x 10^4 células) con 100 μl de células efectoras y se incubaron durante 4 horas a 37ºC. Se determinó la lisis específica para cada pocillo como se ha descrito antes.

Se encontró que células desarrolladas en presencia de flt3+IL-15+Ligando de zalfa11 presentaban actividad lítica aumentada (alrededor de 2 veces) contra las objetivo YAC-1 (pero no destruyeron el linaje celular testigo de MHC^+ EL4). Con una relación efectora a objetivo (E:T) de 5, células NK generadas en presencia de las 3 citoquinas (Ligando de zalfa11+flt3+IL-15) lisaban el 12% de las células YAC-1, mientras que las células NK expandidas con flt3+IL-15 lisaban el 6% de las objetivo YAC-1. Los experimentos subsiguientes confirmaron esta tendencia.

En un segundo método para determinar la actividad biológica de Ligando de zalfa11 sobre células NK de ratón, se aislaron timocitos de ratón $CD4^-CD8^-$ inmaduros ("doble negativos", DN) usando métodos rutinarios y se los cultivó con IL-15+flt3+IL-7 o IL-15+flt3+IL-2, con o sin Ligando de zalfa11. El día 6 de cultivo, se cosecharon las células y se ensayó la actividad lítica de NK en células YAC-1 y EL4 como se ha descrito antes. Se encontró que las células cultivadas en presencia de Ligando de zalfa11 tenían la mayor actividad lítica en este ensayo, con actividad lítica aumentada sobre las células cultivadas en presencia de las otras citoquinas. Específicamente, los timocitos DN desarrollados con IL-15+flt3+IL-7 destruyeron el 18% de las células YAC-1 con E:T de 24, mientras que las células desarrolladas en presencia de IL-15+flt3+IL-7 más Ligando de zalfa11 destruyeron el 48% de las objetivo con la misma E:T. Los timocitos DN desarrollados en IL-15+flt3+IL-2 destruyeron el 15% de las objetivo YAC-1 con una E:T de 6, mientras que las células desarrolladas con estas 3 citoquinas y Ligando de zalfa11 destruyeron el 35% de las células YAC-1 con una E:T de 9. Se realizó citometría de flujo en las células cultivadas un día antes del ensayo de lisis de NK. Como era cierto para los cultivos de médula ósea, a pesar del efecto proliferativo del Ligando de zalfa11 (el número de células aumenta aproximadamente 2 veces cuando se añade Ligando de zalfa11), no aumentó significativamente la fracción de células $DX5^+$ (17-20% de células totales en los cultivos con IL-7, y 35-46% del total en cultivos con IL-2). Estos datos dan a entender que el Ligando de zalfa11, en combinación con IL-15 y flt3, aumenta la actividad lítica de células NK generadas a partir de médula ósea o timo de ratón.

D. *Actividad de Ligando de zalfa11 de ratón sobre células NK de ratón maduras*

Con el fin de ensayar los efectos de Ligando de zalfa11 de ratón sobre células NK maduras, se aislaron bazos de cuatro ratones C57Bl/6 de 5 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) y se los amasó con platinas de vidrio de terminación escarchada para crear una suspensión de células. Se separaron glóbulos rojos por lisis hipotónica como sigue: se globulizaron células y se separó el sobrenadante por aspiración. Se rompió el glóbulo con vórtice suave, y se añadieron después 900 μl de agua estéril mientras se sacudía, seguidos rápidamente (menos de 5 s más tarde) por 100 μl de 10X HBSS (Gibco/BRL). Se resuspendieron después las células en 10 ml de 1X HBSS y se separaron los restos haciendo pasar las células sobre un filtro de células revestido de malla de nylon (Falcon). Estas células de bazo agotadas de RBC se globulizaron y resuspendieron después en tampón MACS (PBS + 1% de BSA + EDTA 2 mM) y se contaron. Se colorearon 300 x 10^6 células con perlas magnéticas revestidas de anti-DX5 (Miltenyi Biotec) y se seleccionaron positivamente células $DX5^+$ NK sobre una columna de separación MACS VS+, según las instrucciones del fabricante, conduciendo a la recuperación de 8,4 x 10^6 células $DX5^+$ y 251 x 10^6 células $DX5^-$. Cada uno de estos grupos de células se cultivó en placas de 24 pocillos (0,67 x 10^6 células/pocillo, 2 pocillos por condición de tratamiento) en medio RP10 (Ejemplo 22A) solo o con 1) 30 ng/ml de Ligando de zalfa11 de ratón

(Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217), 2) 30 ng/ml de IL-2 de ratón recombinante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), 3) 30 ng/ml de IL-15 humana recombinante (R&D), 4) 30 ng/ml cada uno de Ligando de zalfa11 de ratón y hIL-15 o 5) 30 ng/ml cada uno de mIL-2 y hIL-15. Las células se cosecharon después de 21 horas, se lavaron y se resuspendieron en medio RP10 y contaron. Se ensayo después la capacidad de las células para lisar células objetivo YAC-1 o EL4 marcadas con ^{51}Cr, como se describe en el Ejemplo 22A.

En general, hubo poca actividad de NK de los grupos $DX5^-$ (células no NK), pero las células $DX5^-$ cultivadas con Ligando de zalfa11 y hIL-15 lisaron el 25% de las células objetivo YAC-1 con una E:T de 82. Como comparación, las células $DX5^-$ cultivadas con hIL-15 sola lisaron el 14% de las objetivo YAC-1 con una E:T de 110. Esto sugiere que el Ligando de zalfa11 e IL-15 actúan juntos sobre las células NK $NK1.1^+$ residuales en esta preparación de células. Como para la preparación de células $DX5^+$, el tratamiento con Ligando de zalfa11 de ratón solo no aumentó significativamente su función efectora (su lisis de células YAC-1 fue similar al grupo sin tratar). Como era de esperar, IL-2 y IL-15 mejoraron significativamente la actividad de NK. El mayor nivel de lisis, no obstante, se detectó en el grupo tratado con Ligando de zalfa11 y hIL-15 (65% de lisis de células YAC-1 con una E:T de 3,3, frente a 45% de lisis con una E:T de 4 para el grupo de tratamiento con hIL-15). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que, aunque el Ligando de zalfa11 solo puede no aumentar la actividad de lisis de células NK, aumenta la actividad de lisis de NK de células NK maduras cuando se administra con IL-15.

El receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse en este ensayo para medir efectos de unión, antagonistas o inhibidores del receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, sobre el Ligando de zalfa11.

Ejemplo 23

Proliferación de Ligando de zalfa11 de células T humanas y de ratón en un ensayo de proliferación de células T

A. *Proliferación de Ligando de zalfa11 de ratón de células T de ratón*

Se aislaron células T de ratones C57Bl/16 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) de esplenocitos y linfocitos agrupados de nodos linfáticos (LNs) axilar, braquial, inguinal, cervical y mesentérico. Se amasaron bazos con platinas de vidrio de terminación escarchada para crear una suspensión de células. Los LNs se desgarraron con forceps y se hicieron pasar a través de un tamiz de células para separar restos. Se separaron esplenocitos agrupados y células de LNs en subgrupos CD8+ y CD4+ usando dos columnas de separación magnética MACS sucesivas, según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Se recogieron timocitos completos de los mismos ratones.

Se cultivaron células a razón de 3 x 10^5 células/pocillo (timocitos) o 10^5 células/pocillo (células T maduras) con concentraciones crecientes de Ligando de zalfa11 de ratón purificado (0-30 ng/ml) (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) en placas de fondo plano de 96 pocillos pre-revestidas durante la noche a 4ºC con diversas concentraciones de mAb anti-CD3 2C11 (PharMingen) durante 3 días a 37ºC. El anticuerpo anti-CD3 sirvió para activar las células T de ratón a través del receptor de células T. Cada pocillo se pulsó con 1 μCi de ^3H-timidina el día 2 y se cosecharon y contaron las placas 16 horas después para valorar la proliferación.

Cuando se ensayó Ligando de zalfa11 en ensayos de proliferación de células T, se encontró que co-estimula timocitos de ratón activados con anti-CD3, conduciendo a una producción acelerada de células $CD8^+CD4^-$ (la mayoría de los timocitos cultivados con anti-CD3+Ligando de zalfa11 eran $CD8^+CD4^-$ el día 3 de cultivo, mientras que las células cultivadas con anti-CD3 solo no se desviaron significativamente a este fenotipo hasta el día 5). No se observaron niveles significativos de proliferación de timocitos a Ligando de zalfa11 en ausencia de anti-CD3.

De modo interesante, cuando se ensayaron células T de ratón periféricas maduras por su capacidad para responder a Ligando de zalfa11+anti-CD3, se encontró que sólo el $CD8^+$, pero no el subgrupo $CD4^+$, respondía de una manera dependiente de la dosis a Ligando de zalfa11. Se observó también una proliferación débil pero reproducible de células $CD8^+$ (pero no células $CD4^+$) en respuesta a Ligando de zalfa11 solo. De manera interesante, no se observó esto para células T humanas (véase siguiente Ejemplo 22B).

B. *Proliferación de Ligando de zalfa11 humano de células T humanas*

Se aislaron células T CD4+ y CD8+ humanas de PBMC como se ha descrito en el Ejemplo 14. Se cultivaron células a razón de aproximadamente 10^5 células/pocillo con concentraciones crecientes de Ligando de zalfa11 humano purificado (0-50 ng/ml) (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) en placas de fondo plano de 96 pocillos pre-revestidas durante la noche a 4ºC con diversas concentraciones de mAb anti-CD3 humana UCHT1 (PharMingen) durante 3 días a 37ºC. Cada pocillo se pulsó con 1 μCi de ^3H-timidina el día 2 y se cosecharon y contaron las placas 16 horas después. A diferencia de los resultados con células T de ratón, los datos preliminares sugieren que Ligando de zalfa11 humano co-estimula células T humanas CD4+ pero no CD8+, de una manera dependiente de la dosis.

El receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, pueden usarse en este ensayo para medir efectos de unión, antagonistas o inhibidores del receptor zalfa11 soluble o el polipéptido heterodímero de zalfa11 soluble, tal como zalfa11/IL-2Rγ soluble, sobre el Ligando de zalfa11.

Ejemplo 24

Anticuerpos monoclonales de receptor zalfa11 humano

Se prepararon anticuerpos monoclonales de receptor zalfa11 inmunizando 5 ratones BalbC machos (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) con la proteína recombinante purificada huzalfa11-CEE-BHK (Ejemplo 6). Se dio a cada ratón una inyección intraperitoneal (IP) inicial de 20 mg de proteína purificada en coadyuvante de Freund completo (Pierce, Rockford, IL) seguida por inyecciones IP de refuerzo de 10 mg de proteína purificada en coadyuvante de Freund incompleto cada dos semanas. De siete a diez días después de administrar la tercera inyección de refuerzo, se sangró a los animales y se recogió el suero.

Las muestras de suero de los ratones producidas para la huzalfa11-CEE-BHK se caracterizaron por una comprobación del título ELISA usando proteína de huzalfa11-Fc de CHO recombinante purificada (Ejemplo 10C) como objetivo de anticuerpo. Una muestra de suero de ratón tenía título para el objetivo de anticuerpo específico con una dilución de 1:1.000.000 (1:1E6). Cuatro muestras de suero de ratón tenían título para el objetivo de anticuerpo específico con una dilución de 1:100.000 (1:1E5).

Se cosecharon esplenocitos de los 4 ratones de alto título y se fusionaron a células de mieloma SP2/0 de ratón usando PEG 1500 (Boerhinger Mannheim, R.U.) en dos procedimientos de fusión separados usando una relación de fusión 4:1 de esplenocitos a células de mieloma (*Antibodies: A Laboratory Manual*, E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 10 días de crecimiento post-fusión, se identificaron por ELISA hibridomas que producen anticuerpos específicos usando como objetivo de anticuerpo proteína de zalfa11-Fc4 humana BHK recombinante purificada (Ejemplo 6C) y por FACS usando células Baf3 que expresan la secuencia de huzalfa11 (Ejemplo 2) como objetivo de anticuerpo. Los 4 hibridomas resultantes positivos por ambos métodos se clonaron tres veces por dilución limitante. Los anticuerpos se denominaron: 249.28.2.1.2.2; 247.10.2.15.4.6; 249.19.2.2.3.5; y 249.15.2.4.2.7.

Ejemplo 25

Estudio dosis-respuesta de proteína humana recombinante purificada de receptor zalfa11 en ratones normales

A. *Sumario*

Se trataron ratones C57Bl/6 hembras de nueve semanas de edad normales (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) por inyección intraperitoneal una vez al día durante siete días con uno de tres niveles de dosis de receptor soluble zalfa11-Fc4 humano recombinante purificado (Ejemplo 6C) (5, 50 o 250 μg/ratón/día) o vehículo PBS más 250 μg por dosis de BSA. Se comprobaron los pesos corporales cada dos días. El día siete, se sacrificaron los cinco ratones del grupo de dosis más alta y cinco del grupo testigo con vehículo. Se cosecharon y analizaron sangre, médula ósea y tejidos. Los ratones restantes se sacrificaron y se hicieron cosechas al día siguiente. Se examinaron perturbaciones potenciales en tejidos linfoides, así como parámetros fisiológicos y toxicológicos generales.

No hubo evidencia clínica de toxicidad. Se pesaron hígado, riñón, bazo, timo y cerebro, y no había diferencias entre los grupos de tratamiento en pesos de órganos. No se encontraron cambios histológicos en los tejidos examinados.

B. *Preparación de soluciones de dosificación*

Se diluyó proteína de fusión receptor zalfa11-FC4 humana recombinante purificada (zalfa11-FC4) (Ejemplo 6C) en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) (GibcoBRL, Grand Island, NY) en concentraciones para entregar 5, 50 o 250 microgramos de proteína en 0,1 ml de vehículo PBS. Se disolvió albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) en PBS para hacer una dosis de 250 μg por 0,1 ml, y se filtró después a través un filtro de punta de jeringa de 0,2 μm para el tratamiento testigo con vehículo. Las soluciones para dosificación diaria se hicieron el Día 0, se dividieron en partes alícuotas y congelaron en un congelador a -20ºC escarchado para su uso. El día de administración, se descongelaron las partes alícuotas apropiadas y se inyectaron intraperitonealmente 0,1 ml de solución a aproximadamente media mañana cada día durante siete días.

C. *Diseño del estudio*

Los ratones tenían nueve semanas de edad al comienzo del estudio. Cada grupo de tratamiento con zalfa11-FC4 consistía en cinco ratones; el grupo testigo tenía 10 ratones. Los ratones de la dosis más alta y la mitad de los ratones testigo se sacrificaron el día después del último de los siete tratamientos (Día 7). Los dos grupos de dosis más baja y testigo restantes se sacrificaron al día siguiente (Día 8).

Se registraron los pesos corporales de los ratones cada dos días durante el tratamiento. No hubo diferencia de ganancia de peso entre los grupos de tratamiento durante la semana de tratamiento.

En el sacrificio, se cosecharon tejidos para valorar poblaciones de linfocitos por análisis FACS, incluidos médula ósea, timo y bazo. El análisis de citometría de flujo de los órganos linfoides y la médula ósea se realizó con el FACSCalibur (Becton Dickinson, Mansfield, MA). Los tejidos cosechados para examen histológico de signos de toxicidad de la proteína incluían: bazo, timo, hígado, riñón, glándula suprarrenal, nodo linfático mesentérico, duodeno,

páncreas, yeyuno, esternón, útero, ovarios, vejiga urinaria y vesícula biliar, glándula salival, corazón y pulmones. Todos los tejidos fijados para histología se mantuvieron a 4ºC durante la noche en solución salina tamponada normal al 10% (Surgipath, Richmond, IL). Al día siguiente se sustituyó la NBF por etanol del 70% y se devolvieron los tejidos a 4ºC hasta tratamiento para histología.

Los tejidos se trataron y colorearon para análisis H&B en las propias instalaciones y se enviaron después al patólogo contratado, David Fairchild. Se recogió sangre para cuentas de células sanguíneas completas y perfiles de química del suero. Las CBC's se hicieron en las propias instalaciones con el analizador de hematología Cell Dyn 3500 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). El suero se mantuvo congelado en un congelador a -20ºC escarchado hasta sumisión al Phoenix Central Laboratory (Everett, WA) para paneles de química del suero completa. Para comparar las relaciones mieloide:eritroide entre los grupos de dosis de 250 μg de zalfa11R y BSA, se aplicó una parte alícuota de la médula ósea de un fémur a platinas CytoSpin (CYTOSPIN 3 CYTOCENTRIFUGE y CYTO SLIDES, Shandon, Pittsburg, PA). Las platinas de médula ósea se analizaron en los Phoenix Central Laboratories.

D. *Resultados del estudio*

No hubo indicaciones clínicas evidentes de efectos fisiológicos o de toxicidad de la proteína de fusión de rh-zalfa11R-FC4 a las dosis ensayadas (250 μg/día o inferior). Los pesos corporales permanecieron normales durante la duración de los tratamientos. Las cuentas de glóbulos rojos y plaquetas fueron normales. Hubo dos ratones en el grupo de dosis de 250 μg de zalfa11-FC4 cuya cuenta de WBC diferencial reveló una posible elevación del porcentaje de monocitos, aunque los otros tres ratones del grupo tenían porcentajes de monocitos equivalentes a la media de los ratones testigo. La diferencia de cuentas de monocitos de glóbulos blancos diferenciales no se considera un hallazgo significativo. No hubo otras diferencias en las cuentas de sangre completa. La citología de la médula ósea no reveló un cambio de las poblaciones de progenitores mieloide y eritroide, y todos los tipos de células presentes parecían normales. Todos los parámetros de química del suero estándar estaban en intervalos normales. No hubo diferencias entre los grupos de tratamiento en los pesos del timo, bazo, riñón, hígado o cerebro. La evaluación histológica de los siguientes tejidos no mostró evidencia de anormalidades: timo, bazo, hígado, riñón, cápsula suprarrenal, duodeno, páncreas, yeyuno, ciego, colon, nodos linfoides mesentéricos, útero, ovarios, glándula salival, corazón, tráquea, pulmón y cerebro. La ausencia de efectos fisiológicos en raones normales indica que el receptor soluble zalfa11 tiene baja toxicidad *in vivo*, lo que es deseable para un agente terapéutico.

Ejemplo 26

Proliferación dependiente de Ligando de zalfa11 de células B estimuladas anti-CD40 o anti-IgM

A. *Purificación de células B humanas*

Un vial que contenía 1 x 10^8 células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humana sometida a aféresis, congelada, se descongeló rápidamente en un baño a 37ºC y se resuspendió en 25 ml de medio de células B (medio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 10% de suero de bovino fetal inactivado por calor, 5% de L-glutamina, 5% de penicilina/estreptomicina) (Gibco BRL)) en un tubo de 50 ml (Falcon VWR, Seattle, WA). Se ensayó la viabilidad de las células usando Trypan Blue (Gibco BRL). Se estratificaron bajo la suspensión de células diez mililitros de Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) y se centrifugó durante 30 minutos a 1.800 rpm y se dejó detener sin frenar. Se separó después la interfase y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml nuevo, se llevó hasta un volumen final de 40 ml con PBS y se centrifugó durante 10 minutos a 1.200 rpm con el freno puesto. La viabilidad de las células aisladas se ensayó usando Trypan Blue. Alternativamente, se diluyó sangre humana extraída recientemente 1:1 con PBS (Gibco BRL) y se estratificó sobre Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia), se centrifugó y se lavó como antes. Las células aisladas de fuentes reciente o congelada dieron resultados equivalentes.

Se purificaron células B de las células de sangre periférica puestas a flotar en Ficoll de donantes humanos normales (anteriores) con perlas magnéticas anti-CD19 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante. La pureza de las preparaciones resultantes se comprobó por análisis de citometría de flujo con Ab anti-CD22 FITC (Pharmingen, San Diego, CA). Las preparaciones de células B tenían típicamente >90% de pureza.

B. *Purificación de células B de ratón*

Se preparó una suspensión de esplenocitos de ratón desgarrando bazos de ratones C57Bl/6 adultos (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con agujas curvadas en medio de células B. Se separaron RBCs por lisis hipotónica. Las células positivas CD43 se separaron con perlas magnéticas de CD43 (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. Se comprobó la pureza de las preparaciones resultantes por análisis citométrico de flujo con Ab anti-CD45R FITC (Pharmingen). Las preparaciones de células B eran típicamente de >90% de pureza.

C. *Proliferación de células B estimuladas con anti-CD40 en presencia de Ligando de zalfa11 humano o de ratón*

Las células B de la fuente humana o de ratón se resuspendieron con una concentración final de 1 x 10^6 células/ml en medio de células B y se pusieron en placa a razón de 100 μl/pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos (Falcon, VWR) que contenían diversas condiciones de estimulación para llevar el volumen final a 200 μl/pocillo. Para estimulación anti-CD40, se suplementaron cultivos humanos con 1 μg/ml de anti-CD40 humano (Genzyme,

Cambridge, MA) y se suplementaron los cultivos de ratón con 1 μg/ml de anti-CD40 de ratón (Serotec, R.U.). Se añadió Ligando de zalfa11 humano o de ratón (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) con diluciones variables de 1 pg/ml-100 ng/ml según fue apropiado. La especificidad del efecto de Ligando de zalfa11 se confirmó por inhibición de Ligando de zalfa11 con 25 mg/ml de zalfa11CEE humano soluble (Ejemplo 6A). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las células se incubaron después a 37ºC en un incubador humidificado durante 120 horas (humano) o 72 horas (de ratón). Dieciséis horas antes de cosechar, se añadió a todos los pocillos 1 μCi de ^{3}H-timidina (Amersham, Piscataway, NJ) para valorar si habían proliferado las células B. Se cosecharon las células en una placa de filtro de 96 pocillos (UniFilter GF/C, Packard, Meriden, CT) usando una cosechadora de células (Packard) y se recogieron según las instrucciones del fabricante. Se secaron las placas a 55ºC durante 20-30 minutos y se cerró el fondo de los pocillos con un cerrador de placas opaco. Se añadieron a cada pocillo 0,25 ml de fluido de escintilación (Microsint-O, Packard) y se leyó la placa usando un contador de escintilación TopCount Microplate (Packard).

La incubación con Ligando de zalfa11 en concentraciones de 3 ng/ml o más aumentó la proliferación inducida por anti-CD40 soluble de una manera dependiente de la dosis en ambas células B de ratón y humanas en tanto como 30 veces. Las células B de ratón y humanas respondieron igualmente también a su respectivo Ligando de zalfa11. En ambas especies, la estimulación era específica para Ligando de zalfa11, porque se invertía por la presencia de receptor zalfa11 soluble en el cultivo.

D. *Proliferación de células B estimuladas anti-IgM en presencia de Ligando de zalfa11 humano o de ratón*

Las células B de fuente humana o de ratón como se ha descrito antes (partes A y B) se pusieron en placa como se ha descrito antes (parte C). Para estimulación anti-IgM de células humanas, se pre-revistieron las placas durante la noche con 10 mg/ml de Abs anti-IgM humana F(ab')$_2$ (Southern Biotech Associates, Birmingham, Alabama) y se lavaron con medio estéril inmediatamente antes de usar. Los cultivos se suplementaron con 0-10 ng/ml de hu rIL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Para estimulación anti-IgM de células de ratón se añadió a los cultivos anti-IgM soluble (Biosource, Camarillo, CA) a razón de 10 mg/ml. Para cada una de las condiciones anti-IgM/IL-4 precedentes, se añadió Ligando de zalfa11 humano o de ratón con diluciones variables de 1 pg/ml a 100 ng/ml como se ha descrito antes. La especificidad del efecto de Ligando de zalfa11 se confirmó por inhibición con receptor zalfa11 humano soluble como se ha descrito antes (Parte C). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las células se incubaron, marcaron con ^{3}H-timidina, cosecharon y analizaron como se ha descrito en la parte C anterior.

La incubación con Ligando de zalfa11 en concentraciones de 0,3 ng/ml o más inhibió la proliferación inducida por anti-IgM (ratón) insoluble o anti-IgM e IL-4 (humano) de una manera dependiente de la dosis. Esta inhibición era específica para Ligando de zalfa11, porque se invertía por la presencia de receptor zalfa11 soluble en el cultivo.

E. *La proliferación de células B anti-CD40 requiere receptor IL-2 gamma*

Se purificaron células B de ratón y estimularon con anticuerpo monoclonal anti-CD40 como se ha descrito en el Ejemplo 26B y C anterior. La co-estimulación inducida por Ligando de zalfa11 de ratón se bloqueó completamente por adición de anticuerpos monoclonales anti-receptor IL2 gamma (IL-2Rγ) que bloquean la utilización de IL-2γ. Los anticuerpos 3E12 y TUG/m2 (PharMingen, San Diego, CA) se incluyeron en el ensayo de proliferación a razón de 50 μg/ml. Estos resultados demuestran que el IL-2Rγ en células B está implicado fisiológicamente con la estimulación por Ligando de zalfa11 de células B. Además, estos resultados proporcionan un soporte funcional indirecto *in vivo* para encontrar que el IL-2Rγ se heterodimeriza con el receptor zalfa11 *in vitro* (siguiente Ejemplo 27).

F. *Los efectos de Ligando de zalfa11 en células B son inhibidos por construcciones de receptor zalfa11 soluble*

Se purificaron células B de ratón y estimularon con anticuerpo monoclonal anti-CD40 o anticuerpos anti-IgM como se ha descrito en el Ejemplo 26C y D anterior. El efecto inducido por Ligando de zalfa11 de ratón se bloqueó completamente por adición de receptor soluble heterodímero hu-zalfa11R:IL-2Rγ purificado (Ejemplo 28) o un receptor soluble heterodímero mu-zalfa11-Fc (Ejemplo 6C). Nuevamente, estos resultados proporcionan soporte funcional adicional para encontrar que el IL-2Rγ se heterodimeriza con el receptor zalfa11 (siguiente Ejemplo 27), y actúa como antagonista para el efecto de Ligando de zalfa11 en células B.

Ejemplo 27

Receptor zalfa11 humano se heterodimeriza con receptor de IL-2 gamma

A. *Ensayo usando medio acondicionado de células BHK-570 transfectadas que expresan Ligando de zalfa11 humano*

Se biotinaron receptor zalfa11 humano soluble zalfa11CFLAG (Ejemplo 6B) o gp130 (Hibi, M. *et al., Cell* 63: 1149-1157, 1990) por reacción con un exceso molar de cinco veces de sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Inc., Rockford, IL) según el método del fabricante. Se marcaron receptor zalfa11 soluble y receptor de Il-2-γ (sIL-2Rγ) (R&D Systems, Minneapolis, MN) con un exceso molar de cinco veces de Ru-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) según el método del fabricante. Las formas biotinada y marcada con Ru-BPY-NHS del receptor zalfa11 soluble se

denominaron respectivamente receptor Bio-zalfa11 y Ru-zalfa11; las formas biotinada y marcada con Ru-BPY-NHS del IL-2Rγ soluble se denominaron respectivamente Bio-IL2Rγ y Ru-IL2Rγ.

Para caracterización de la unión a receptor inicial de Ligando de zalfa11 humano, se usaron medio acondicionado de células BHK-570 transfectadas que expresan Ligando de zalfa11 humano o medio testigo de células BHK-570 no transfectadas para determinar si el Ligando de zalfa11 podría mediar en la homodimerización de receptor zalfa11 y si podría mediar en la heterodimerización de receptor zalfa11 con IL-2Rγ o gp130. Para hacer esto, se combinaron 50 μl de medio acondicionado, de células testigo o medio acondicionado de células que expresan Ligando de zalfa11, con 50 μl de TBS-B (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 1 mg/ml de BSA, pH 7,2) que contienen 400 ng/ml de receptor Ru-zalfa11 y Bio-zalfa11, o 400 ng/ml de receptor Ru-zalfa11 y Bio-gp130 o 400 ng/ml de Ru-IL2Rγ y Bio-zAlf11. Tras la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron 30 μg de perlas magnéticas de 2,8 mm, revestidas con estreptavidina (Dynal, Inc., Oslo, Noruega) y se incubó la reacción una hora más a temperatura ambiente. Se añadieron después 200 μl de tampón de ensayo ORIGEN (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) y se midió la extensión de asociación de receptor usando un analizador M8 ORIGEN (Igen, Inc.).

El medio acondicionado que contenía Ligando de zalfa11 causó la heterodimerización de receptor Bio-zalfa11 con Ru-IL2Rγ. No se observó dimerización de receptor en presencia de medio testigo. El medio acondicionado que contenía Ligando de zalfa11 no causó la homodimerización de receptor Ru-zalfa11 con receptor Bio-zalfa11, ni la heterodimerización de receptor Ru-zalfa11 con Bio-gp130.

B. *Ensayo usando Ligando de zalfa11 humano purificado*

Para valorar la especificidad del ligando de la heterodimerización de receptor zalfa11 e IL2Rγ, se combinaron 50 μl de TBS-B que contenían 400 ng/ml de receptor Ru-zalfa11 y Bio-zAlf11, o 400 ng/ml de Ru-IL2Rγ y Bio-zAlf11, con 50 μl de TBS-B que contenían IL-2, IL-4, IL-15 o Ligando de zalfa11 humano purificado (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) con concentraciones de 133 pg/ml a 300 ng/ml. Tras la incubación durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron 3 μg de perlas magnéticas de 2,8 mm revestidas con estreptavidina (Dynal, Inc.) y la reacción se incubó una hora más a temperatura ambiente. Se añadieron después 200 μl de tampón de ensayo Origlo (Igen, Inc.) y se midió la extensión de la asociación de receptor usando un analizador M8 Origen (Igen, Inc.). El Ligando de zalfa11 humano causó la heterodimerización de receptor Bio-zalfa11 con Ru-IL-2Rγ de una manera dependiente de la dosis con una concentración semimáxima de 10 ng/ml. No se observó homodimerización de receptor Ru-zalfa11 con Bio-zalfa11 con ninguna concentración de Ligando de zalfa11 ensayada. No se observó homodimerización de receptor Ru-zalfa11 con receptor Bio-zalfa11 o heterodimerización de receptor Bio-zalfa11 con IL-2, IL-4 o IL-15 con ninguna de las concentraciones ensayadas. Así, los resultados muestran que el receptor zalfa11 humano se heterodimeriza específicamente con el receptor de IL-2-γ en presencia de Ligando de zalfa11 humano, y que el receptor zalfa11 no se homodimeriza o heterodimeriza en presencia de otras citoquinas ensayadas.

Ejemplo 28

Construcción para generar heterodímero receptor zalfa11 humano/IL-2Rγ

Se construyó un vector que expresa un heterodímero hzalfa11/hIL2Rgamma humano segregado. En esta construcción, el dominio extracelular de hzalfa11 estaba fusionado a la cadena pesada de IgG gamma 1 (IgGγ1 (IgGγ1) (SEQ ID NO: 16), mientras que la porción extracelular de hIL-2Rγ estaba fusionada a una cadena ligera kappa humana (cadena ligera κ humana) (SEQ ID NO: 18).

A. *Construcción de vectores de fusión de IgG gamma 1 y cadena ligera κ humana*

La cadena pesada de IgGγ1 se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem229R (depósito ATCC Nº 69447) de tal modo que puede clonarse cualquier porción extracelular de un receptor que tenga un lugar de EcoRI 5' y de NheI 3' produciendo una fusión dominio extracelular N-terminal-IgGγ1 C-terminal. El fragmento de IgGγ1 usado en esta construcción se hizo usando PCR para aislar la secuencia de IgGγ1 de una genoteca de cADN Clontech hFetal Liver como plantilla. Se realizó como sigue una reacción PCR usando oligos ZC11,450 (SEQ ID NO: 50) y ZC11,443 (SEQ ID NO: 51): 40 ciclos de 94ºC durante 60 s, 53ºC durante 60 s, y 72ºC durante 120 s; y 72ºC durante 7 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un juego de extracción de gel QiaQuick® (Qiagen). El fragmento de ADN aislado, de 990 pb, se digirió con Mlu I y EcoRI (boerhinger-Mannheim), se precipitó con etanol y se ligó con oligos ZC11,440 (SEQ ID NO: 52) y ZC11,441 (SEQ ID NO: 53), que comprenden un enlazador de MluI/EcoRI, en Zem229R digerido previamente con, y EcoRI, usando técnicas de biología molecular estándares descritas aquí. El vector de clonación genérico se denominó Vector#76 hIgGgamma1 w/ Ch1 #786 Zem229R (Vector #76). La secuencia de polinucleótido del dominio extracelular de hzalfa11 fusionado a la cadena pesada de IgG gamma 1 se muestra en SEQ ID NO: 15 y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 16.

La cadena ligera κ humana se clonó en el vector de expresión de mamífero Zem228R (depósito ATCC Nº 69446) de tal modo que puede clonarse cualquier porción extracelular de un receptor que tenga un lugar de EcoRI 5' y un lugar de KpnI 3' produciendo una fusión dominio extracelular N-terminal-cadena ligera κ humana C-terminal. El fragmento de cadena ligera κ humana usado en esta construcción se hizo usando PCR para aislar la secuencia de cadena ligera

κ humana de la misma genoteca de cADN Clontech hFetal Liver usada antes. Se realizó en las condiciones descritas antes una reacción PCR usando oligos ZC11,501 (SEQ ID NO: 54) y ZC11,451 (SEQ ID NO: 55). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se purificaron usando un juego de extracción de gel QiaQuick® (Qiagen). El fragmento de ADN aislado, de 315 pb, se digirió con Mlu I y EcoRI (boerhinger-Mannheim), se precipitó con etanol y se ligó con el enlazador de MluI/EcoRI descrito antes en Zem228R digerido previamente con, y EcoRI, usando técnicas de biología molecular estándares descritas aquí. Este vector de clonación genérico se denominó Vector#77 hKligero #774 Zem228R (Vector #77). La secuencia de polinucleótido del dominio extracelular de hIL-2Rγ se fusionó a una cadena ligera kappa humana como se muestra en SEQ ID NO: 17 y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 18.

B. *Inserción de dominios extracelulares de receptor zalfa11 o IL-2Rγ en construcciones de vector de fusión*

Usando los vectores de construcción anteriores, se hizo una construcción que tiene zalfa11 humano fusionado a IgGγ1. Esta construcción se hizo sometiendo a PCR receptor zalfa11 humano de una genoteca de médula ósea CD4+ (seleccionada y hecha en las instalaciones propias) con oligos ZC24,052 (SEQ ID NO: 56) y ZC24,053 (SEQ ID NO: 57), en condiciones descritas como sigue: 30 ciclos de 94ºC durante 60 s, 57ºC durante 60 s y 72ºC durante 120 s; y 72ºC durante 7 min. El producto de PCR resultante se digirió con EcoRI y NheI, se purificó con gel como se ha descrito antes y se ligó a Vector#76 (anterior) digerido con EcoRI y NheI previamente y purificado en banda. Se determinó la scuencia del vector resultante para confirmar que la fusión zalfa11/IgG gamma 1 (hzalfa11/Ch1 IgG) humanaera correcta. El vector hzalfa11/Ch1 IgG gamma 1 se denominó Vector#190.

Se construyó también una construcción separada que tenía IL-2Rγ fusionado a ligera κ. La construcción IL-2Rγ/cadena ligera κ humana se realizó como antes sometiendo a PCR a partir de la misma genoteca de CD4+ mencionada antes con oligos ZC12,834 (SEQ ID NO: 58) y ZC12,831 (SEQ ID NO: 59), digiriendo la banda resultante con EcoRI y KpnI y ligando después este producto a un Vec#77 (anterior) digerido previamente con EcoRI y KpnI y purificado en banda. Se determinó la secuencia del vector resultante para confirmar que la fusión IL-2Rγ humano/cadena ligera κ humana (hIL-2Rγ/Kligera) era correcta. Se denominó a este vector hIL-2 gamma/Kligera #1052 Zem228R Vector#101.

D. *Co-expresión de los receptores zalfa11 humano e IL-2Rγ humano*

Aproximadamente 16 μg de cada uno de los Vectores #190 y #101 anteriores se co-transfectaron en células BHK-570 (ATCC Nº CRL-10314) usando reactivo LipofectaminePlus® (Gibco/BRL) según las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10 días en DMEM + 5% de FBS (Gibco/BRL) que contenía metotrexato 1 μM (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) y 0,5 mg/ml de G418 (Gibco/BRL) durante 10 días. El agrupamiento de transfectantes resultante se seleccionó de nuevo en MTX 10 μM y 0,5 mg/ml de G418 durante 10 días.

El agrupamiento resultante de células doblemente seleccionadas se usó para generar proteína. Three Factories (Nunc, Dinamarca) de este agrupamiento se usaron para generar 10 l de medio acondicionado exento de suero. Este medio acondicionado se hizo pasar sobre una columna de 1 ml de proteína-A y se eluyó en fracciones de 750 microlitros (10). 4 de estas fracciones de las que se encontró que tenían la más alta concentración se agruparon y dializaron (corte de P.m. 10 kD) frente a PBS. Finalmente, el material dializado se sometió a análisis de aminoácidos (AAA) y se encontró que tenía una concentración de 227,17 μg/ml de AAA. Se obtuvo un total de 681,5 μg de esta purificación de 10 l. Se usó el receptor zalfa11 humano/receptor IL-2Rγ purificado para valorar su capacidad para competir con el Ligando de zalfa11 humano en un ensayo de proliferación de BaF3 (siguiente Ejemplo 29).

Ejemplo 29

Receptor zalfa11 humano soluble/receptor de IL2 gamma humano-Fc como antagonista de Ligando de zalfa11

Se pusieron en placa células BaF3 que expresan establemente el receptor zalfa11 humano (Ejemplo 2) a razón de 5500 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos estándares en medio de base más 3 ng/ml de Ligando de zalfa11 humano. El medio de base es 500 ml de RPMI 1640 (JRH Biosciences), 5 ml de piruvato sódico 10x (Gibco BRL), 5 ml de L-glutamina 100x (Gibco BRL) y 50 ml de suero de bovino fetal (FBS) inactivado por calor (Hyclone Laboratories). Se añadió a las células una dosis decreciente de homodímero receptor zalfa11 humano soluble-Fc purificado (Ejemplo 6C) o heterodímero receptor zalfa11 humano soluble/receptor de IL2 gamma humano-Fc purificado (Ejemplo 27). Se realizó un ensayo de proliferación Alamar Blue y se hizo fluorimetría como en el Ejemplo 2B.

El heterodímero receptor zalfa11/receptor de IL2 gamma-Fc inhibió la actividad de Ligando de zalfa11 humano de una manera dependiente de la dosis, siendo capaces 0,312 μg/ml de inhibir completamente la actividad de 3 ng/ml de Ligando de zalfa11 humano. El homodímero receptor zalfa11-Fc soluble también era capaz de inhibir la actividad de Ligando de zalfa11 de una manera dependiente de la dosis, aunque requería aproximadamente 10 μg/ml de homodímero soluble para inhibir completamente la actividad de 3 ng/ml de Ligando de zalfa11. Estos datos sugirieron que el receptor soluble heterodímero receptor zalfa11/receptor de IL2 gamma-Fc es aproximadamente de 30 a 100 veces más potente que el receptor zalfa11 soluble homodímero para inhibir Ligando de zalfa11 humano.

Ejemplo 30

Distribución de receptor zalfa11

Para valorar la distribución de receptor zalfa11 en diversos tipos de células, se generaron anticuerpos policlonales de conejo y monoclonales (mAbs) de ratón dirigidos contra el receptor humano (Ejemplo 24 y Ejemplo 10) y se conjugaron estos anticuerpos con biotina para su uso en citometría de flujo. Se usaron inicialmente los anticuerpos policlonales, que eran de afinidad relativamente baja, para colorear un panel de linajes celulares: células BaF3 de tipo natural de linaje celular pre-B de ratón dependientes de IL-3 (Palacios y Steinmetz, *ibid.*; Mathey-Prevot *et al., ibid.*); células BaF3 transfectadas con zalfa11 humano (Ejemplo 2); linajes celulares de linfoma de Burkitt humano Raji (ATCC Nº CCL-86), Ramos (ATCC Nº CRL-1596), RPMI 8226 (ATCC Nº CCL-155) y Daudi (ATCC Nº CCL-213); linaje celular de leucemia de células T humana Jurkat (ATCC Nº TIB-152); linajes celulares de leucemia mielomonocítica humana Thp-1 (ATCC Nº TIB-202) y U937 (ATCC Nº CRL-1593.2); células pro-mielomonocíticas humanas HL-60 (ATCC Nº CCL-240); linaje celular de linfoma de células B de ratón A20 (ATCC Nº TIB-208); y linaje celular de timoma de ratón EL4 (ATCC Nº TIB-39).

Las células se cosecharon y se lavaron una vez con tampón de lavado FACS con suero (WBS). El WBS consistía en solución salina equilibrada de Hank (Gibco/BRL) + HEPES 10 mM (Gibco/BRL) + 1% de BSA (Sigma) + 10% de suero de cabra normal (Gemini Bioproducts, Woodland, CA) + 10% de suero de conejo normal (Sigma); el tampón de lavado (WB) era idéntico a WBS excepto que está exento de suero. Después de lavar, se resuspendieron las células en 100 μl de WB que contenía 10 μg/ml de anticuerpos policlonales anti-zalfa11 de conejo (Ejemplo 10). Las células se mantuvieron en hielo con Ab durante 20 min, se lavaron después con WB y se resuspendieron en WB que contenía anti-FITC de conejo, de cabra (BioSource, International), se incubaron otros 20 min en hielo, y se lavaron después y resuspendieron en 400 μl de WB para análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Se colorearon muestras testigo con el Ab anti-FITC de conejo, de cabra, secundario sólo. Aunque los anticuerpos policlonales eran de baja afinidad, se confiaba razonablemente en que se detectaría expresión de zalfa11 en el transfectante de BaF3/zalfa11, en los cuatro linfomas de Burkitt humanos (Raji, Ramos, Daudi y RPMI 8226), y en células T de Jurkat. Los datos con los linajes celulares monocíticos eran más ambiguos. Las células HL-60 en reposo (no diferenciadas) no se unieron a los anticuerpos anti-zalfa11, pero se detectó una señal positiva en células HL-60 activadas durante 24 horas con PMA (Calbiochem, La Jolla, CA) que induce diferenciación de células HL-60 en una célula de tipo monocito. Se vio también una señal positiva en células U937 y Thp-1, aunque esta señal puede haber sido debida a unión no específica. Los anticuerpos policlonales reaccionan cruzadamente débilmente en el linaje de células B de ratón A20, pero no se vio coloración del timoma de ratón EL4.

Los cuatro anticuerpos monoclonales anti-zalfa11 (Ejemplo 24) se conjugaron a biotina, y se examinó la expresión de receptor zalfa11 de un subgrupo de las células descritas antes (BaF3, BaF3/zalfa11, Raji, Jurkat y HL-60 en reposo). Las células se cosecharon, se lavaron y se resuspendieron después en 100 μl de WB que contenía 15 μg/ml de uno de cada uno de los 4 mAbs biotinados. Las células se incubaron con mAb durante 20 min en hielo, se lavaron después con 1,5 ml de WB y se globulizaron en una centrífuga. El sobrenadante se separó por aspiración y los glóbulos se resuspendieron en 100 μl de estreptavidina conjugada a CyChrome (CyC-SA; PharMingen), se incubaron después en hielo durante otros 20 min y se lavaron y globulizaron como antes. Los tubos testigo contenían células coloreadas sólo con CyC-SA. Los glóbulos se resuspendieron en 400 μl de WB y se realizó como antes citometría de flujo. Se definió coloración positiva como una señal que supera el nivel de fondo de coloración con CyC-SA solo. Usando como testigo el transfectante de BaF3/zalfa11, se pudo clasificar a los 4 mAbs en términos de sus respectivas intensidades de fluorescencia medias (MFI), que pueden reflejar la afinidad del anticuerpo y/o la extensión de la biotinación de los mAbs. Los mAbs se clasificaron como sigue, de las MFI más altas a más bajas: 249.28.2.1.2.2, 247.10.2.15.4.6, 249.19.2.2.3.5 y 249.15.2.4.2.7. Este modelo era esencialmente el mismo en ambas células Raji y Jurkat, indicando que zalfa11 se expresa en estos linajes de células B y T. Los modelos de coloración en células HL60 no activadas eran idénticos para todos los mAbs, y la señal era muy débil. Se especula con que esto no refleja la expresión real de zalfa11 por este linaje celular, sino que es más bien función de una unión no específica de los mAbs de ratón a las células humanas, probablemente mediante receptores Fc.

Ejemplo 31

Reconstitución de receptor zalfa11 humano in vitro

Para identificar componentes implicados en el complejo de señalización de zalfa11, se realizaron como sigue estudios de reconstitución del receptor. Células BHK 570 (ATCC Nº CRL-10314) transfectadas, usando métodos descritos aquí, con el plásmido informador de luciferasa KZ134 (Ejemplo 19) sirvieron como linaje celular de bioensayo para medir la respuesta de transducción de señal de un complejo receptor de zalfa11 transfectado al informador de luciferasa en presencia de Ligando de zalfa11. Las células BHK no expresan endógenamente el receptor zalfa11. El linaje celular de bioensayo se transfectó con receptor zalfa11 solo, o se co-transfectó con receptor zalfa11 junto con una de una variedad de otras subunidades de receptor conocidas. Cada subunidad de receptor se clonó usando PCR seguida por ligación en vectores de expresión apropiados; se confirmó la secuencia correcta de cada construcción antes de la transfección. Se ensayó la expresión de receptor de linajes celulares por RT/PCR antes de los ensayos. Los complejos receptores ensayados incluían: receptor zalfa11 sol;: receptor zalfa11 con IL-2Rγ; receptor zalfa11 con IL-2Rγ e IL-2Rβ; receptor zalfa11 con IL-2Rγ e IL-13Rα; receptor zalfa11 con IL-2Rγ e IL-2Rα; y receptor zalfa11 con IL-2Rγ e IL-4Rα. Cada linaje celular de complejo receptor independiente se ensayó en presencia de Ligando de zalfa11

humano y se midió la actividad de luciferasa como se ha descrito en el Ejemplo 19. El linaje celular de bioensayo no transfectado sirvió como testigo para la actividad de luciferasa de fondo, y se usó como línea de base para comparar la señalización por las diversas combinaciones de complejo receptor. En cada linaje celular que contenía receptor zalfa11 e IL-2Rγ, la máxima actividad de luciferasa fue de aproximadamente dos veces sobre el fondo en presencia de Ligando de zalfa11. No se observó aumento de señal en presencia de cualquier otra subunidad de receptor ensayada (IL-2Rβ, IL-2Rα, IL-4Rα o IL-13Rα).

Otros complejos receptores de zalfa11 que pueden valorarse por este método incluyen combinaciones de receptor zalfa11 con uno o más de los componentes receptores de la familia de receptores de IL-4/IL-13 (IL-13Rα'), así como otros receptores de interleuquina (por ejemplo, IL-15Rα, IL-7Rα, IL-9Rα).

Ejemplo 32

Estudio de unión de Ligando de zalfa11 humano marcado con ^{125}I en linajes celulares

Se marcaron 25 microgramos de Ligando de zalfa11 humano purificado (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) con 2 mCi de ^{125}I usando yodoperlas (Pierce, Rockford, Illinois) según las instrucciones del fabricante. Esta proteína marcada se usó para valorar la unión de Ligando de zalfa11 humano a células Raji humanas (ATCC Nº CCL-86), usando unión a células BaF3 de ratón de tipo natural, y células BaF3 transfectadas con receptor zalfa11 (células BaF3/hzalfa11) como testigos. Se esperaba la unión de Ligando de zalfa11 a células BaF3/hzalfa11 (testigo positivo), mientras que no se esperaba unión a células BaF3 de tipo natural (testigo negativo), en base a resultados de ensayos de proliferación (Ejemplo 2). Se pusieron cada una de ellas en placas de 96 pocillos aproximadamente 5 x 10^5 células Raji/pocillo, 1 x 10^6 células BaF3/hzalfa11/pocillo y 1 x 10^6 células BaF3/pocillo. Se añadió por duplicado a los pocillos diez ng/ml de Ligando de zalfa11 humano marcado, con una serie de diluciones de competidor Ligando de zalfa11 humano no marcado añadido desde un exceso molar de 250 veces en diluciones 1:4 hasta un exceso molar de 0,061 veces. Cada punto se realizó por duplicado. Después de añadir a los pocillos el Ligando de zalfa11 humano marcado, se le dejó incubar a 4ºC durante 2 h para permitir la unión de Ligando a las células. Se lavaron después las células 3X en tampón de unión (RPMI-1710 (JRH Biosciences) con 1% de BSA (Sigma)) y se contaron en el contador gamma COBRA II AUTO-GAMMA (Packard Instrument Company, Meriden, CT).

La unión del Ligando de zalfa11 marcado a células era evidente en las células Raji y BaF3/hzalfa11. Además, para células Raji, un exceso molar medio de 250 veces de Ligando de zalfa11 no marcado disminuyó la unión 3 veces en presencia de un competidor no marcado no específico (Interferón gamma de R&D Systems, Minneapolis, MN) y 3,7 veces con relación a no competidor. Se observó competición de manera dependiente de la dosis para el competidor no marcado específico, Ligando de zalfa11 humano. Así, la unión de Ligando de zalfa11 a células Raji era específica. De modo similar, para células BaF3/zalfa11 testigos positivos, el exceso molar de 250 veces de Ligando de zalfa11 no marcado disminuyó la unión 2 veces con relación a al competidor no específico y 3,06 veces con relación a no competidor. Así, la unión de Ligando de zalfa11 a células BaF3/zalfa11 también era específica. No se observó unión competitiva con las células BaF3 de tipo natural. Así, se mostró que el Ligando de zalfa11 se une específicamente a células Raji y a células BaF3/hzalfa11, pero no a las células BaF3 testigo negativo.

El Ligando de zalfa11 radiomarcado unido se reticula después con la molécula a la que se une en la superficie celular de células Raji usando métodos de reticulación estándares, para identificar el complejo receptor al que se une en estas células. Además, se emplean anticuerpos anti-receptor zalfa11 (Ejemplo 24 y Ejemplo 10) y otros anticuerpos anti-subunidad de receptor de citoquina para valorar qué componentes de la subunidad comprenden un complejo receptor hzalfa11 funcional, por ejemplo, en las células Raji y otros linajes celulares a los que se une Ligando de zalfa11. Tales anticuerpos pueden usarse para competir por Ligando de zalfa11 en un ensayo de unión como se ha descrito antes, y muestran por ello qué subunidades de receptor están presentes en la superficie de células Raji, y en otros linajes celulares a los que se une Ligando de zalfa11. Además, tales anticuerpos pueden usarse para inmunoprecipitar material reticulado de Ligando de zalfa11 radiomacado usando métodos conocidos en la técnica y descritos aquí. Además, pueden usarse anticuerpos anti-Ligando de zalfa11 (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) para inmunoprecipitar material reticulado de Ligando de zalfa11 radiomarcado.

Ejemplo 33

Expresión de receptor zalfa11 en células de sangre humana

A. *Preparación y cultivo de células de sangre periférica humana*

Se diluyó 1:1 sangre humana recién extraída con PBS (GIBCO BRL) y se estratificó sobre Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) y centrifugó durante 30 minutos a 1.800 rpm y dejó pararse sin frenar. Se separó la capa de interfase y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml nuevo (Falcon, VWR; Seattle, WA), se llevó hasta un volumen final de 40 ml con PBS y se centrifugó durante 10 minutos a 1.200 rpm con el freno puesto. Se ensayó la viabilidad de las células aisladas usando Trypan Blue (GIBCO BRL) y se resuspendieron las células con una concentración final de 1 x 10^6 células/ml de medio de células (medio RPMI 1640, 10% de suero de bovino fetal inactivado por calor, 5% de L-glutamina, 5% de penicilina/estreptomicina) (GIBCO BRL).

Se cultivaron células en placas de 6 pocillos (Falcon, VWR) durante 0, 4 o 24 horas con una variedad de diferentes estímulos descritos después. Se hizo estimulación anti-IgM, anti-CD40 y anti-CD3 como en el Ejemplo 26. Se añadieron miristato acetato de forbol (PMA) e ionomicina (Sigma, St. Louis, MO) a pocillos apropiados a razón de 10 ng/ml y 0,5 mg/ml respectivamente. Las células se incubaron a 37ºC en un incubador humidificado durante diversos períodos de tiempo.

B. *Coloración y análisis de anticuerpos*

Se recogieron células fuera de las placas, se lavaron y se resuspendieron en medio de coloración enfriado con hielo (HBSS, 1% de suero de bovino fetal, 0,1% de azida sódica) con una concentración de aproximadamente diez millones de células por militro. El bloqueo del receptor Fc y la unión no específica de anticuerpos a las células se consiguieron añadiendo 10% de suero de cabra normal (Gemini Bioproducts, Woodland, CA) y 10% de suero humano normal (Ultraserum, Gemini) a la suspensión de células. Se mezclaron partes alícuotas de las suspensiones de células con un anticuerpo monoclonal marcado con FITC contra uno de los marcadores de linajes CD3, CD19 o CD14 (PharMingen, La Jolla, CA) y un anticuerpo monoclonal biotinado contra el receptor zalfa11 humano (hu-zalfa11) (Ejemplo 24). Después de incubación en hielo durante 60 minutos, se lavaron las células dos veces con medio de coloración enfriado con hielo y se resuspendieron en 50 ml de medio de coloración que contenía estreptavidina-PE (Caltag, Burlingame, CA). Después de una incubación de 30 minutos en hielo, se lavaron las células dos veces con tampón de lavado enfriado con hielo (PBS, 1% de suero de bovino fetal, 0,1% de azida sódica) y se resuspendieron en tampón de lavado que contenía 1 mg/ml de 7-AAD (Molecular Probes, Eugene, OR) como marcador de viabilidad. Se obtuvieron datos de flujo en células vivas usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). La obtención y el análisis se realizaron usando software CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

Los resultados mostraron que el receptor zalfa11 humano se expresa en células de sangre periférica humana que expresan CD3, CD19 o CD14. La activación de células T con anti-CD3 o de células B con anti-CD40 produjo un nivel aumentado de zalfa11 de la superficie celular a las 24 horas. No se vio aumento del nivel de expresión de zalfa11 a las 4 horas con algún estímulo en cualquier población de células. El tratamiento de las células con Ligando de zalfa11 produjo una disminución de la coloración de zalfa11 en células positivas en CD3 y positivas en CD19 pero no en células positivas en CD14 a las 4 y las 24 horas.

Ejemplo 34

La actividad de Ligando de zalfa11 humano es bloqueada con anticuerpos anti-IL-2Rγ en un ensayo de proliferación de BaF3/zalfa11

El papel del receptor de IL-2γ se investigó usando anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-2γ para valorar si bloquearían la actividad de Ligando de zalfa11 en un ensayo de proliferación de BaF3/zalfa11 (Ejemplo 2). Se añadió al ensayo medio acondicionado de células BHK570 transfectadas con el Ligando de zalfa11 humano en concentraciones del 5%, 2,5%, 1,25% y 0,625%, con o sin anticuerpos de receptor de IL-2.

Se añadieron a razón de 50 μg/ml cada uno los siguientes anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-2 de ratón de PharMingen International, San Diego, California: (a) 4G3 + TUGm2 o (b) TM-β1. 4G3 y TUGm2 son anticuerpos anti-cadena γ_c de ratón, TM-β1 es un anticuerpo anti-CD122 de ratón (cadena de receptor de IL-2 β) purificado. Los resultados de los ensayos demostraron una inhibición casi completa de la respuesta de Ligando de zalfa11 con la combinación de anticuerpo 4G3 + TUGm2 en comparación con el testigo sin anticuerpo. El anticuerpo TM-β1 no tuvo efecto. Estos resultados sugieren un papel para el receptor de IL-2 γ en la respuesta proliferativa de Ligando de zalfa11, y soporta además que el IL-2Rγ se heterodimeriza con el receptor zalfa11 para obtener esa respuesta.

Ejemplo 35

Manosilación post-traducción de polipéptido de receptor zalfa11 en un residuo de Trp altamente conservado

La manosilación del receptor zalfa11 humano se valoró usando el método para manosilación C-2 de triptófano como se describe en Hofsteenge, J. *et al., Biochemistry* 33: 13524-13530, 1994, y Loeffler, A. *et al., Biochemistry* 35: 12005-14, 1996. Además, estos investigadores mostraron que en un motivo de aminoácidos WXXW (SEQ ID NO: 67), puede manosilarse el Trp.

Un receptor zalfa11 soluble que lleva una etiqueta Glu-Glu (CEE) (SEQ ID NO: 14) o FLAG (SEQ ID NO: 23) C-terminal se expresó en células BHK y se purificó por cromatografía de afinidad anti-Flag o anti-EE (Ejemplo 4A). Un receptor zalfa11 soluble etiquetado C-terminalmente con una etiqueta Fc4 (SEQ ID NO: 25) y expresado en células CHO se purificó por afinidad mediante cromaografía de afinidad anti-Fc4 (Ejemplo 4B). Estos polipéptidos se dividieron enzimáticamente para generar fragmentos de péptidos para el estudio.

Todas las digestiones enzimáticas se realizaron durante la noche con una concentración de proteína de 1,0 mg/ml. Se realizó digestión con PNGaseF (Oxford GlycoSciences, Abingdon, Oxford, R.U.) diluyendo cada polipéptido de receptor zalfa11 soluble en un tampón de EDTA 50 mM, fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, e incubándolo con 0,4 U de enzima por μg de proteína. La digestión con Glu-C (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana) se realizó con una relación 1:50 de enzima a proteína intercambiando tampón la muestra en NH_4HCO_3 25 mM pH 7,8

e incubándolo a 25ºC, excepto para el material etiquetado con Fc4, que se digirió en fosfato sódico 50 mM pH 7,8 + 5% de acetonitrilo (EM Science, Darmstadt, Alemania) a 37ºC. La digestión con Glu-C generó un péptido que contiene WSXWS de zalfa11 como se muestra del aminoácido 178 (Leu) al aminoácido 199 (Ser) de SEQ ID NO: 6 (197 (Leu) al aminoácido 218 (Ser) de SEQ ID NO: 2). La digestión con Asp-N (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana) se realizó intercambiando tampón la proteína en fosfato sódico 50 mM pH 7,7 e incubándolo a 37ºC con enzima en una relación 1:50 a polipéptido de receptor zalfa11. La digestión con Asp-N generó un péptido que contenía WSXWS de zalfa11 como se muestra del aminoácido 179 (Glu) al aminoácido 210 (Ser) de SEQ ID NO: 6 (198 (Leu) al aminoácido 229 (Glu) de SEQ ID NO: 2).

Se realizaron análisis LCMS y LCMS-MS en un Magic HPLC (Michrom Bioresources, Auburn, CA) conectado en línea a un espectrómetro de masas Finnigan LCQ (Finnigan MAT, San Jose, CA). La separación LC se hizo en una columna Vydac C4 5 μ 300 Å (Michrom Bioresources) con un gradiente de elución del 20%-80% de disolvente B durante 80 minutos en el que el disolvente A fue 2% de acetonitrilo + 0,1% de TFA y el disolvente B fue 90% de acetonitrilo + 0,095% de TFA (EM Science; Sigma, St. Louis, MO). El espectrómetro de masas LCQ se fijó para recoger espectros MS durante la duración de la prueba. El análisis LCMS-MS de digeridos del polipéptido se realizó en el mismo sistema de instrumento usando una columna Vydac C18 5 μ 300 Å (Michrom Bioresources) con un gradiente de elución del 5-65% de disolvente B durante 80 minutos con el mismo sistema de disolvente descrito antes para el análisis LCMS. El espectrómero de masas LCQ se configuró para recoger espectros MS, de exploración con zoom y MS-MS para cada ion durante un umbral mínimo.

La extensión de la manosilación de triptófano se estimó comparando intensidades iónicas para los iones 2+ y 3+ de los péptidos que contienen el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) de la digestión con Glu-C y Asp-N descrita antes. Se determinó primero la composición de pico utilizando los datos de MS y se generó un mapa del péptido. Seguidamente, se creó un espectro medio partiendo aproximadamente 1 minuto antes del péptido que contiene WSXWS (SEQ ID NO: 13) manosilado que eluye temprano y terminando aproximadamente 1 minuto después de su péptido compañero no manosilado que eluye más tardío. Se compararon las intensidades normalizadas de los iones correspondientes a péptido manosilado y no manosilado y se usaron para generar un número de porcentaje de ocupación. Los valores generados para ambos estados de carga 2+ y 3+ se promediaron para generar un valor de ocupación porcentual para cada digerido. Este valor se promedió después con el valor del digerido compañero para cada lote de proteína para generar un valor final.

La Tabla 7 resume los datos que se calcularon para cada péptido-etiqueta y célula hospedante usados para expresión de receptor soluble zalfa11.

TABLA 7

Etiqueta C-terminal	Hospedante de expresión	% de WSXWS manosilado
Glu-Glu	BHK	~46%
FLAG	BHK	~35%
Fc4	CHO	~11%

Un experto en la técnica apreciaría que la manosilación o no manosilación del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) del receptor zalfa11 puede afectar a la capacidad del receptor zalfa11 o receptor soluble zalfa11 para homodimerizarse, heterodimerizarse y/o su capacidad para unirse al Ligando de zalfa11. Como la manosilación de receptor zalfa11 parece diferir dependiendo del tipo de célula en el que se expresa el receptor, la optimización de la expresión y producción de receptor zalfa11 y polipéptidos de receptor solubles puede tomar en consideración si el receptor zalfa11 producido por la célula está manosilado o no manosilado. Como tal, un experto en la técnica apreciaría que los polipéptidos de la presente invención pueden estar manosilados o no manosilados.

Como el acontecimiento de manosilación es dentro del motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) del receptor de citoquina clase I zalfa11, la manosilación del Trp o su falta puede afectar funcionalmente al polipéptido. Por ejemplo, inserciones o supresiones en el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) del EPOR pueden abrogar expresión en la superficie celular, destruir o reducir respuesta proliferativa, disminuir internalización del receptor y afectar a la unión de EPO (Yoshimura, A. *et al., J. Biol. Chem.* 267: 11619-11625, 1992; Quelle, DE *et al., Mol. Cell. Biol.* 12: 4553-4561, 1992; Hilton, DJ *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 190-194, 1995). Sin embargo, la mutación en el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) puede producir también una exportación más eficaz del ER y mayor expresión del receptor en la superficie celular (Hilton, DJ *et al., supra*). También se han visto los efectos en la expresión en la superficie celular, unión de ligando y respuesta estimuladora con estudios en el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) y motivos relacionados en análisis mutacional sobre IL-2Rβ, GM-CSFR y GHR (Miyazaki *et al., EMBO J.* 10: 3191-3197, 1991; Ronco, L.V. *et al., J. Biol. Chem.* 269: 277-283, 1994; Baumgartner, JW *et al., J. Biol. Chem.* 269: 29094-29101, 1994).

De modo similar, la manosilación del residuo de Trp en el motivo WSXWS (SEQ ID NO: 13) de polipéptidos de receptor zalfa11, incluyendo receptores de longitud completa y solubles descritos aquí, puede tener implicacio-

nes estructurales y funcionales importantes tales como que tengan efectos sobre la estabilidad global del receptor, proporción de proteolisis, elaboración intracelular, antigenicidad, expresión en la superficie celular, dimerización o multimerización, unión a co-receptor, señalización o internalización, efectos sobre la unión de Ligando de zalfa11 y estabilidad de interacción receptor-ligando. Puede hacerse una comparación de receptores zalfa11 manosilados y no manosilados usando cristalografía de rayos X o NMR en polipéptidos de zalfa11 purificados (por ejemplo, receptores solubles), o estudios funcionales que comparen el zalfa11 expresado en linajes celulares que están manosilados (por ejemplo, BHK u otro linaje celular) o son defectuosos o reducidos en manosilación (por ejemplo, CHO u otro linaje celular) y comparando los receptores en los diversos ensayos descritos aquí.

Ejemplo 36

Estudios de unión de transfectantes de BHK

Se yodó con ^{125}I (Amersham) usando yodo-perlas (Pierce) proteína de Ligando de zalfa11 humano purificado (25 μg) (Solicitud de Patente de los EE.UU. de propiedad común Nº 09/522.217) y se purificó en una columna Sephadex G25 PD-10 (Pharmacia). Se pusieron en placa transfectantes de BHK (Ejemplo 31) que expresan zalfa11 humano solo o zalfa11 humano + receptor IL-2Rγ humano a razón de 30 K/pocillo en una placa de 24 pocillos 24 horas antes del estudio de unión. Se incubaron transfectantes de BHK durante 2 horas a 4ºC con 2,5 ng (0,147 pmoles) de ^{125}I Ligando de zalfa11 (actividad específica 6,4 x 10^7 cpm/μg) en presencia de diversas concentraciones de Ligando de zalfa11 frío (en un intervalo de aproximadamente un exceso de 10.884 veces a no competición en 15 diluciones de 4 veces). Se lavaron las células tres veces con tampón de unión antes de la lisis en NaOH 0,8 M, seguida por recuento de emisión gamma. El análisis de estos datos produjo una afinidad de aproximadamente 1 nM para los transfectantes de zalfa11 y aproximadamente 0,1 nM para los transfectantes de receptor zalfa11 humano + IL-2Rγ humano. Este resultado sugirió que el Ligando de zalfa11 tiene alta afinidad sobre el receptor zalfa11 humano homodímero o zalfa11 humano + IL-2Rγ humano heterodímero, y que la afinidad es mayor para el heterodímero.

Ejemplo 37

Proteína de fusión de receptor zalfa11-mG2a homodímero de ratón

Se usó el vector de expresión pEZE2 para expresar la proteína de fusión receptor zalfa11 de ratón-IgGamma2A Fc de ratón (zalfa11m-mG2a). La secuencia de ADN de la proteína de fusión dominio extracelular de zalfa11 de ratón región Fc de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 2a de ratón (zalfa11m-mG2a) se muestra en SEQ ID NO: 72, y la secuencia de polipéptido correspondiente se muestra en SEQ ID NO: 73.

El vector pEZE2 es un plásmido derivado de pDC312 (Immunex Corp., Seattle, WA), y contiene un segmento EASE como se describe en la Publicación WIPO WO 97/25420. La presencia del segmento EASE en un vector de expresión puede mejorar la expresión de proteínas recombinantes aproximadamente dos a ocho veces en agrupamientos de células estables. El plásmido pEZE2 es un vector de expresión dicistrónico que puede usarse para expresar dos proteínas diferentes en células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO). La unidad de expresión de pEZE2 contiene un aumentador/promotor de CMV; una secuencia líder tripartita de adenovirus; un lugar de clonación múltiple (MCS) para inserción de la región de codificación para la proteína recombinante de interés; un lugar de entrada de ribosoma interno del virus de la encéfalomiocarditis; un segmento de codificación para dihidrofolato reductasa de ratón; y el terminador de transcripción del SV40. Además, pEZE2 contiene un origen de replicación de *E. coli* y el gen de beta lactamasa bacteriana.

La proteína de fusión zalfa11m-mG2a es un homodímero enlazado por disulfuro consistente en dos cadenas del dominio extracelular de zalfa11 de ratón fusionadas a una región Fc de inmunoglobulina gamma 2a de ratón de tipo natural. La inmunoglobulina gamma 2a Fc de ratón confiere funciones efectoras, unión de FcγRI y fijación de complemento C1q. La construcción de fusión de dominio extracelular de zalfa11 de ratón región constante Fc de inmunoglobulina gamma 2a de ratón se generó por PCR de superposición de tres fragmentos de ADN separados, generado cada uno por reacciones de multiplicación PCR separadas. El primer fragmento contenía una secuencia señal de tPA (activador de plasminógeno de tejidos) optimizada (SEQ ID NO: 80). La secuencia señal tPA optimizada (otPA) se multiplicó usando cebadores de oligonucleótidos ZC26,644 (SEQ ID NO: 74) y ZC26,641 (SEQ ID NO: 75) usando como plantilla un vector de expresión generado previamente en las propias instalaciones. La mezcla de reacción PCR contenía 20 pmoles de cada cebador, 10 ng de cADN de plantilla, cada dNTP 20 μM, 1X tampón de Taq (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 0,5 μl de polimerasa Taq en una reacción de 100 μl. Condiciones de PCR: 1 ciclo, 94ºC, 2 minutos, 25 ciclos, 94ºC, 30 segundos, 60ºC, 30 segundos, 72ºC, 30 segundos, 1 ciclo, 72ºC, 5 minutos. El segundo fragmento contenía la región de codificación de dominio extracelular de zalfa11 de ratón de los aminoácidos 20 a 257 de SEQ ID NO: 12. Los cebadores de oligonucleótidos ZC26,642 (SEQ ID NO: 76) y ZC26,662 (SEQ ID NO: 77) se usaron para multiplicar este segmento de zalfa11 de ratón usando como plantilla un clon generado previamente de zalfa11 de ratón (SEQ ID NO: 11). Este fragmento de PCR se hizo usando la misma mezcla de reacción PCR especificada antes. Las condiciones de racción PCR fueron como sigue: 1 ciclo, 94ºC, 2 minutos, 25 ciclos, 94ºC, 30 segundos, 50ºC, 30 segundos, 72ºC, 45 segundos, 1 ciclo, 72ºC, 5 minutos.

La región Fc de cadena pesada de gamma 2a de ratón se generó a partir de un clon generado previamente de cADn de cadena pesada de Ig gamma 2a de ratón. El segmento que contiene los dominios bisagra, C_H2 y C_H3 de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 2a de ratón se generó mediante multiplicación por PCR

usando cebadores de oligonucleótidos ZC26,643 (SEQ ID NO: 78) y ZC26,645 (SEQ ID NO: 79). Este fragmento de PCR se hizo usando la misma mezcla de reacción especificada antes. Las condiciones de PCR fueron como sigue: 1 ciclo, 94ºC, 2 minutos, 25 ciclos, 94ºC, 30 segundos, 60ºC, 30 segundos, 72ºC, 30 segundos, 1 ciclo, 72ºC, 5 minutos.

Para preparar el segmento de codificación de proteína de fusión, se enlazaron tres dominios que codifican proteína por PCR de superposición usando oligonucleótidos ZC26,644 (SEQ ID NO: 74) y ZC26,662 (SEQ ID NO: 77) para enlazar los dos primeros productos de PCR y ZC26,644 (SEQ ID NO: 74) y ZC26,645 (SEQ ID NO: 79) para enlazar en la región Fc. Se establecieron dos reacciones: La primera funcionó 25 ciclos de 94ºC durante 2 min, 55ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 1 min y 30 s. La otra reacción funcionó 25 ciclos de 94ºC durante 2 min, 60ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 1 min y 30 s. Los productos de PCR de las dos reacciones se agruparon y purificaron usando el juego de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) según el método del fabricante. El producto se eluyó en 60 μl de tampón. Se digirieron 30 μl de este eluido con enzimas de restricción Fse1 y Asc1 en tampón de NEB 10X diluido Nº 4 (New England Biolabs, Beverly, MA) según las instrucciones del fabricante. El material se hizo pasar después en un gel de agarosa de 1% de TAE y se cortó la banda de aproximadamente 1.500 pb y se purificó el ADN usando un juego de extracción con gel de agarosa Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El fragmento se eluyó en 30 μl de H_2O.

Para preparar el vector receptor para el inserto, se digirieron aproximadamente 3 μg de vector pEZE2 con Asc1 y Fse1 de la misma manera anterior, con la excepción de 1 μl de fosfatasa intestinal de becerro (CIP) (New England Biolabs) añadido después de la digestión con enzimas de restricción (se dejó transcurrir la reacción 2 horas más). El vector se hizo pasar después en un gel de agarosa y se purificó como antes. El material se eluyó en 30 μl de H_2O.

El segmento de codificación de la proteína de fusión se clonó en el MCS de pEZE2 desde el lugar de FseI hasta el lugar de AscI en el polienlazador, y se ligó en 20 μl usando reactivos y procedimientos de biología molecular estándares. La reacción de ligación se incubó durante la noche a 16ºC. Aproximadamente 4 μl de esta mezcla de ligación se sometieron a electroporación en 50 μl de células electrocompetentes de *E. coli* DH12s (Life Technologies, Rockville, MD) y se rescataron las células en 1 ml de medio LB y se las dejó sacudir/incubar durante 1 h y se extendieron 100 μl en placas de agar Amp 100. Se permitió incubar las placas durante la noche a 37ºC. Se analizó la secuencia de una colonia simple. Se encontró una mutación que produciría un cambio de Glu a Lys en posición 25 de SEQ ID NO: 73. Esta sustitución de aminoácido es dentro de la líder de otPA, y puede haber producido un tratamiento impropio del péptido señal, porque el N-terminal mostró que la secuencia líder estaba dividida incompletamente y comenzaba en un residuo de piroglutamina aguas arriba del comienzo predicho. Sin embargo, esta construcción homodímera era aún activa para inhibir al Ligando de zalfa11 (Ejemplo 40).

Se creó una prep grande usando el juego de prep Qiagen Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El plásmido se usó para transfectar células CHO. Las células se seleccionaron en medio sin hipoxantina o timidina y el transgen se multiplicó usando metotrexato (Ejemplo 38). Se ensayó la presencia de proteína por manchas de Western usando una región constante de cadena pesada anti gamma 1 humana y anticuerpos anti cadena ligera kappa humana (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA).

Ejemplo 38

Producción de zalfa11m-mG2A en células CHO DG-44

Se digirieron 20 μg de una construcción zalfa11m-mG2A/pEZE2 con 40 unidades de Pvu I a 37ºC durante tres horas y se precipitó después con isopropanol y glubulizó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El sobrenadante se separó por aspiración del glóbulo y el glóbulo se resuspendió en 100 μl de agua. Se añadieron aproximadamente 200 μg (20 μl) de ADN de esperma de salmón cizallado a la construcción zalfa11m-mG2A/pEZE2 digerida. La mezcla de ADN se co-precipitó usando 0,1 volúmenes de acetato sódico (pH 5,2) y 2,2 volúmenes de etanol. El tubo se puso en hielo seco durante 15 minutos y se centrifugó después en una microcentrífuga a 14.000 rpm durante 15 minutos, formando un glóbulo de ADN. El sobrenadante se separó por aspiración del glóbulo, y el glóbulo se lavó con 1 ml de etanol del 70% y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se separó por aspiración del glóbulo. Se permitió al glóbulo secarse al aire durante 30 minutos. Se resuspendió después el glóbulo en 100 μl de agua y se le dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron al ADN en el tubo de microcentrífuga 500 μl que contenían aproximadamente 5 x 10^6 células CHO DG-44, y se puso después la mezcla ADN/células en una cubeta de 0,4 cm de abertura y se sometió a electroporación usando los siguientes parámetros: 1.070 μF, alta capacidad y 376 v. Se separó después el contenido de la cubeta y se diluyó hasta 25 ml con medio exento de proteína PF-CHO EX-CELL® 325 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) con L-glutamina 3 mM y se puso en un matraz de sacudidas de 125 ml. El matraz se puso en un incubador sobre un sacudidor a 37ºC y 6% de CO_2 y se sacudió a 120 rpm.

El cultivo de CHO DG-44 zalfa11m-mG2A se multiplicó con metotrexato (MTX) usando métodos estándares hasta un nivel de MTX final de MTX 50 nm. El cultivo se clonó con dilución y se examinó usando una serie de manchas de Western. Se escogió un clon final y se seleccionó adicionalmente en MTX hasta un nivel de MTX 200 nM y se extrapoló después para producción. La producción de cada lote del clon se consiguió sembrando 8X matraces rotativos de 4 l con 2 l de cultivo a razón de aproximadamente 5 x 10^5 células/ml. Se centrifugaron los cultivos a 70 rpm, se mantuvieron a 37ºC y 6% de CO_2 y se les dejó incubar durante 72 o 96 horas. Se precipitaron las células por centrifugación y se filtraron los sobrenadantes a través de 0,2 μm. Se recuperó un número suficiente de células para

sembrar la siguiente serie de matraces. Se produjeron de esta manera cuatro lotes totales para purificación de proteína Ejemplo 39).

Ejemplo 39

Purificación de la proteína de receptor soluble zalfa11m-mG2A homodímero

Todos los procedimientos se realizaron a 4ºC, salvo indicación en contrario. Se capturó directamente medio acondicionado (Ejemplo 38) en una columna POROS 50 A dimensionada apropiadamente (proteína acoplada A; PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) con un caudal de captura óptimo. La columna se lavó con 20 volúmenes de columna (CV) de tampón de carga, y se eluyó después rápidamente con 3 CV de glicina 0,1 M pH 2,5. Las fracciones recogidas tenían un volumen predeterminado de Tris 2 M pH 8,0 añadido antes de la elución para neutralizar el pH a aproximadamente 7,2.

Se hicieron pasar geles NuPAGE coloreados con Brilliant Blue (Sigma) para analizar la elución. Las fracciones de interés se agruparon y concentraron frente a un concentrador centrífugo MWCO de 30 kD hasta un volumen nominal. El agrupamiento de Proteína A concentrada se inyectó en una columna Phamicia Sephacryl 200 (Pharmacia) dimensionada apropiadamente para separar agregados y para intercambiar el tampón de la proteína a PBS pH 7,2.

Se usaron de nuevo para analizar la elución geles NuPAGE (NOVEX) coloreados con Brilliant Blue (Sigma). Las fracciones se agruparon y concentraron como antes hasta ~1-2 mg/ml. Se hicieron pasar geles NuPAGE (NOVEX) coloreados con Western y Brilliant Blue (Sigma) para confirmar la pureza y el contenido. Además, se sometió la proteína a análisis de aminoácidos (AAA) y determinación de la secuencia N-terminal para análisis adicional.

Ejemplo 40

Proteína de fusión de zalfa11m-mg2A homodímera soluble como antagonista de Ligando de zalfa11

Se pusieron en placa células BaF3 que expresan establemente el receptor zalfa11 de ratón (construído según el Ejemplo 2 usando cebadores para SEQ ID NO: 11) a razón de 5.500 células por pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos estándares en medio de base más 3 ng/ml de Ligando de zalfa11 humano. El medio de base es 500 ml de RPMI 1640 (JRH Biosciences), 5 ml de piruvato sódico 100X (Gibco BRL), 5 ml de L-glutamina 100X (Gibco BRL) y 50 ml de suero de bovino fetal (FBS) inactivado por calor (Hyclone Laboratories). Se añadió a las células una dosis decreciente de zalfa11m-mg2A homodímera purificada (Ejemplo 39). Se realizó una ensayo de proliferación con Alamar Blue y se realizó fluorimetría como en el Ejemplo 2B.

La proteína de fusión de zalfa11m-mg2A homodímero inhibió la actividad de Ligando de zalfa11 humano de una manera dependiente de la dosis, siendo capaces 1-5 μg/ml de inhibir la actividad de 1,25 ng/ml de Ligando de zalfa11 humano.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende subunidades de receptor solubles, en el que el complejo receptor comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, y un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

2. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 1ª, en el que la secuencia de residuos de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID NO: 6.

3. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en el que el complejo receptor comprende un motivo WSXWS como se muestra en SEQ ID NO: 13.

4. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 2ª, en el que la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 es codificada por el polinucleótido como se muestra en SEQ ID NO: 7.

5. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, que codifica un complejo receptor multímero, en el que el complejo receptor multímero comprende además un receptor de citoquina Clase I soluble.

6. Un polinucleótido aislado según cualquier reivindicación precedente, en el que el complejo receptor soluble comprende además una etiqueta de afinidad.

7. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos:

(a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6; y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; y

(b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente.

8. Dos vectores de expresión que comprenden los siguientes elementos:

(a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6; y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; y

(b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente;

en los que el primero y segundo segmentos de ADN están contenidos dentro de vectores de expresión independientes;

y en los que los polipéptidos expresados a partir de dichos segmentos de ADN se asocian para formar un complejo receptor heterodímero o multímero.

9. Un vector de expresión según la reivindicación 7ª, o dos vectores de expresión según la reivindicación 8ª, que comprenden además una secuencia de señal secretora enlazada operativamente al primero y segundo segmentos de ADN.

10. Una célula cultivada que comprende uno o más vectores de expresión que comprenden los siguientes elementos:

(a) un promotor de transcripción; un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor soluble que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6; y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente; y

(b) un segundo promotor de transcripción; un segundo segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4); y un terminador de transcripción, en los que dichos promotor, segmento de ADN y terminador están enlazados operativamente;

en los que el primero y segundo segmentos de ADN están contenidos dentro de un vector de expresión simple o están contenidos dentro de vectores de expresión independientes;

y en la que la célula expresa el polipéptido codificado por los segmentos de ADN.

11. Una célula cultivada según la reivindicación 10ª, en la que el primero y segundo segmentos de ADN están situados en vectores de expresión independientes y se co-transfectan en la célula.

12. Una célula cultivada según la reivindicación 10ª, en la que la célula expresa un complejo receptor soluble heterodímero o multímero codificado por los segmentos de ADN.

13. Una célula según la reivindicación 10ª, en la que la célula segrega un complejo receptor heterodímero o multímero de polipéptido de receptor soluble.

14. Una célula según la reivindicación 10ª, en la que la célula segrega un complejo heterodímero o multímero de polipéptido de receptor soluble que se une a un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagoniza la actividad del ligando.

15. Una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión que comprende:

un primer segmento de ADN que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6; y

al menos otro segmento de ADN que codifica un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4),

en la que el primero y otros segmentos de ADN están conectados enmarcados; y

en la que el primero y otros segmentos de ADN codifican la proteína de fusión.

16. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados operativamente:

un promotor de transcripción;

una construcción de ADN que codifica una proteína de fusión según la reivindicación 15ª; y

un terminador de transcripción,

en el que el promotor está enlazado operativamente a la construcción de ADN, y la construcción de ADN está enlazada operativamente al terminador de transcripción.

17. Una célula cultivada que comprende un vector de expresión según la reivindicación 16ª, en la que la célula expresa un polipéptido codificado por la construcción de ADN.

18. Un método para producir una proteína de fusión codificada por una construcción de ADN según la reivindicación 15ª, que comprende:

cultivar una célula según la reivindicación 17ª, de tal modo que la célula exprese el polipéptido codificado por la construcción de ADN; y

aislar el polipéptido producido por la célula.

19. Un complejo receptor heterodímero o multímero aislado que comprende subunidades de receptor solubles, en las que al menos una de las subunidades de receptor solubles comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

20. Un complejo receptor soluble heterodímero o multímero aislado según la reivindicación 19ª, en el que al menos una de las subunidades de receptor solubles comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6.

21. Un complejo receptor heterodímero o multímero aislado según las reivindicaciones 19ª o 20ª, que comprende un motivo WSXWS como se muestra en SEQ ID NO: 13.

22. Un complejo receptor soluble multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-21ª, en el que al menos una de las subunidades de receptor solubles consiste en un polipéptido de receptor soluble que comprende SEQ ID NO: 6, y en el que al menos otra de las subunidades de receptor solubles consiste en un polipéptido de receptor soluble que comprende polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

23. Un complejo receptor multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-22ª, que comprende además un receptor de citoquina Clase I soluble.

24. Un complejo receptor heterodímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-21ª, que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6 y un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

25. Un complejo receptor heterodímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-21ª o 24ª, consistente en dos subunidades de receptor solubles, en las que la primera subunidad de receptor soluble consiste en un polipéptido del receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y la segunda subunidad del receptor consiste en un polipéptido del receptor soluble que comprende polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

26. Un complejo receptor heterodímero o multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-21ª, o un complejo receptor multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 22ª-23ª, o un complejo receptor heterodímero aislado según alguna de las reivindicaciones 24ª-25ª, en los que el complejo receptor heterodímero se une a un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o antagoniza con la actividad del ligando.

27. Un complejo receptor heterodímero o multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 19ª-21ª o 26ª, o un complejo receptor multímero aislado según alguna de las reivindicaciones 22ª-23ª o 26ª, o un complejo receptor heterodímero aislado según alguna de las reivindicaciones 24ª-26ª, en los que al menos una de las subunidades del receptor soluble comprende además una etiqueta de afinidad, marca, resto químico, toxina, marca de biotina/avidina, radionúclido, enzima, sustrato, cofactor, inhibidor, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, toxina, molécula citotóxica o un dominio Fc de inmunoglobulina.

28. Un método para producir un complejo heterodímero o multímero soluble que comprende:

cultivar una célula según alguna de las reivindicaciones 10ª-14ª o 17ª; y

aislar los polipéptidos del receptor soluble producidos por la célula.

29. Un método para producir un anticuerpo para un complejo receptor heterodímero o multímero soluble, en el que el complejo receptor heterodímero o multímero soluble inoculado comprende SEQ ID NO: 6 y un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4);

en el que el complejo obtiene una respuesta inmune para producir el anticuerpo; y

en el que el anticuerpo se une específicamente a un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende SEQ ID NO: 6 y un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

30. Un método *in vitro* para inhibir un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 47, o para antagonizar con la proliferación inducida por la actividad del ligando de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende:

cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende un complejo receptor heterodímero o multímero que comprende subunidades de receptor solubles, en el que al menos una de las subunidades comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4);

en el que la composición reduce la proliferación de las células hematopoyéticas en las células de médula ósea o sangre periférica en comparación con células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia de complejo receptor soluble.

31. Un método *in vitro* para inhibir un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o para antagonizar con la proliferación inducida por la actividad del ligando de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende:

cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende un receptor soluble, en el que el receptor soluble comprende un complejo receptor heterodímero que comprende subunidades de receptor solubles, en el que la primera subunidad de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que la segunda subunidad de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4);

en el que la composición reduce la proliferación de las células hematopoyéticas en las células de médula ósea o sangre periférica en comparación con células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor soluble.

32. Un método *in vitro* para inhibir un ligando que comprende un polipéptido de SEQ ID NO: 10 o para antagonizar con la proliferación inducida por la actividad del ligando de células hematopoyéticas y progenitores de células hematopoyéticas, que comprende:

cultivar células de médula ósea o de sangre periférica con una composición que comprende un receptor soluble, en el que el receptor soluble comprende un complejo receptor soluble multímero que comprende subunidades de receptor solubles, en el que al menos una de las subunidades de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que

al menos otra de las subunidades de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4);

en el que la composición reduce la proliferación de las células hematopoyéticas en las células de médula ósea o sangre periférica en comparación con células de médula ósea o sangre periférica cultivadas en ausencia de receptor soluble.

33. Un método *in vitro* según alguna de las reivindicaciones 30ª-32ª, en el que al menos una de las subunidades de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6.

34. Un método *in vitro* según alguna de las reivindicaciones 30ª-33ª, en el que las células hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas son células linfoides.

35. Un método *in vitro* según la reivindicación 34ª, en el que las células linfoides son células NK o células T citotóxicas.

36. El uso de un complejo receptor heterodímero o multímero soluble que comprende subunidades de receptor solubles, en las que al menos una de las subunidades comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4), en un vehículo farmacéutico aceptable, para la fabricación de un medicamento para suprimir una respuesta inmune en un mamífero expuesto a un antígeno o patógeno.

37. El uso de un complejo receptor heterodímero o multímero soluble que comprende subunidades de receptor solubles, en las que al menos una de las subunidades comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 6, y en el que el complejo receptor comprende además un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4), para la fabricación de un medicamento para reducir la proliferación de células B o T neoplásticas en un mamífero con un neoplasma de células B o T.

38. El uso de un complejo receptor heterodímero soluble según las reivindicaciones 36ª o 37ª, en el que el complejo receptor heterodímero soluble comprende una primera subunidad de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y una segunda subunidad de receptor soluble que comprende un polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

39. El uso de un complejo receptor multímero soluble según las reivindicaciones 36ª o 37ª, en el que al menos una de las subunidades de receptor solubles comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 6, y en el que al menos otra de las subunidades de receptor soluble comprende un polipéptido de receptor soluble que comprende polipéptido de receptor IL-2Rγ soluble (SEQ ID NO: 4).

40. El uso de un complejo receptor multímero soluble según alguna de las reivindicaciones 36ª-37ª o 39ª, en el que el complejo receptor multímero soluble comprende además un polipéptido de receptor de citoquina Clase I.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZimoGenetics, Inc.

<120> RECEPTORES DE CITOQUINA ZALFA11 SOLUBLES

<130> 00-22PC

<150> US 60/194, 731
<151> 2000-04-05

<160> 86

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1
<211> 1614
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1614)

<400> 1

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
```

```
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
 50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc      240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
 65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc      288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                 85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt      336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg      384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac      432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac      480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160

agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc      528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa      576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc      624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag      672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
```

```
acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac ctg ctg ctt      720
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
225                 230                 235                 240

ctc ctc ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttt tgg agc ctg aag      768
Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
                245                 250                 255

acc cat cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg gcc gtc ccc agc      816
Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
            260                 265                 270

cct gag cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc agc gga gac ttc      864
Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
        275                 280                 285

aag aaa tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc ctg gag ctg gga      912
Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
    290                 295                 300

ccc tgg agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg tac agc tgc cac      960
Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
305                 310                 315                 320

cca cca cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc acg gag cta caa gaa     1008
Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
                325                 330                 335

cca gca gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc aag ccc agc ttc tgg     1056
Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
            340                 345                 350

ccg aca gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac agt gag gag agg gat     1104
Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
        355                 360                 365

cgg cca tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg cta gat gca     1152
Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
    370                 375                 380

gag ggg cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag gat gac ggc tac cca     1200
```

```
Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
385                 390                 395                 400

gcc ctg gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc cca ggc cta gag gac    1248
Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
                405                 410                 415

cca ctc ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc tgt ggc tgt gtc tca    1296
Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
            420                 425                 430

gct ggc agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga agc ctc ctg gac aga    1344
Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445

cta aag cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg gct ggg gga ctg ccc    1392
Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
    450                 455                 460

tgg ggt ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag agt gag gcg ggc tca    1440
Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
465                 470                 475                 480

ccc ctg gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac agt ggc ttt gtg ggc    1488
Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
                485                 490                 495

tct gac tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc ccc ggg gac    1536
Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
            500                 505                 510

gaa gga ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc att cct ccg    1584
Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
        515                 520                 525

cca ctt tcg agc cct gga ccc cag gcc agc                           1614
Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
    530                 535
```

<210> 2

<211> 538

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1               5                  10                  15
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
                245                 250                 255
Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
            260                 265                 270
Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
        275                 280                 285
Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
    290                 295                 300
```

```
Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
305                 310                 315                 320
Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
                325                 330                 335
Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
            340                 345                 350
Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
        355                 360                 365
Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
    370                 375                 380
Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
385                 390                 395                 400
Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
                405                 410                 415
Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
            420                 425                 430
Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
        435                 440                 445
Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
    450                 455                 460
Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
465                 470                 475                 480
Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
                485                 490                 495
Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
            500                 505                 510
Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
        515                 520                 525
Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
    530                 535
```

<210> 3
<211> 696
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(696)

<400> 3

```
ctg aac acg aca att ctg acg ccc aat ggg aat gaa gac acc aca gct      48
Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp Thr Thr Ala
 1               5                  10                  15

gat ttc ttc ctg acc act atg ccc act gac tcc ctc agt gtt tcc act      96
Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser Val Ser Thr
            20                  25                  30

ctg ccc ctc cca gag gtt cag tgt ttt gtg ttc aat gtc gag tac atg     144
Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val Glu Tyr Met
        35                  40                  45

aat tgc act tgg aac agc agc tct gag ccc cag cct acc aac ctc act     192
Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr Asn Leu Thr
    50                  55                  60

ctg cat tat tgg tac aag aac tcg gat aat gat aaa gtc cag aag tgc     240
Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys Val Gln Lys Cys
65                  70                  75                  80

agc cac tat cta ttc tct gaa gaa atc act tct ggc tgt cag ttg caa     288
Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Leu Gln
                85                  90                  95

aaa aag gag atc cac ctc tac caa aca ttt gtt gtt cag ctc cag gac     336
Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp
            100                 105                 110

cca cgg gaa ccc agg aga cag gcc aca cag atg cta aaa ctg cag aat     384
Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys Leu Gln Asn
        115                 120                 125

ctg gtg atc ccc tgg gct cca gag aac cta aca ctt cac aaa ctg agt     432
Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu His Lys Leu Ser
    130                 135                 140

gaa tcc cag cta gaa ctg aac tgg aac aac aga ttc ttg aac cac tgt     480
Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu Asn His Cys
145                 150                 155                 160

ttg gag cac ttg gtg cag tac cgg act gac tgg gac cac agc tgg act     528
Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr
                165                 170                 175
```

```
gaa caa tca gtg gat tat aga cat aag ttc tcc ttg cct agt gtg gat      576
Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp
            180                 185                 190

ggg cag aaa cgc tac acg ttt cgt gtt cgg agc cgc ttt aac cca ctc      624
Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu
        195                 200                 205

tgt gga agt gct cag cat tgg agt gaa tgg agc cac cca atc cac tgg      672
Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp
    210                 215                 220

ggg agc aat act tca aaa gag aat                                     696
Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn
225                 230
```

<210> 4

<211> 232

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

```
Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr
                165                 170                 175
Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp
            180                 185                 190
Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu
        195                 200                 205
Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp
    210                 215                 220
Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn
225                 230
```

<210> 5

<211> 654

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(654)

<400> 5

```
tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc      48
Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys
 1               5                  10                  15

atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg      96
Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp
            20                  25                  30

caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc     144
Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu
        35                  40                  45

cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg     192
His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met
    50                  55                  60

gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca     240
Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr
65                  70                  75                  80

gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct     288
```

```
Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala
                 85                  90                  95

gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg acc ttc tca      336
Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser
            100                 105                 110

gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc ttc      384
Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe
        115                 120                 125

tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac cgg      432
Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg
    130                 135                 140

gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg gac      480
Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp
145                 150                 155                 160

tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc      528
Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser
                165                 170                 175

tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag      576
Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln
            180                 185                 190

ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag tca      624
Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser
        195                 200                 205

gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac                              654
Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His
    210                 215
```

<210> 6

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

<210> 7

<211> 654

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido degenerada de polipéptido de receptor zalfa11 soluble como se muestra en SEQ ID NO: 6

<221> aspecto misc_

<222> (1)...(654)

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

<400> 7

```
tgyccngayy tngtntgyta yacngaytay ytncaracng tnathtgyat hytngaratg   60
tggaayytnc ayccnwsnac nythacnytn acntggcarg aycartayga rgarytnaar  120
gaygargcna cnwsntgyws nytncaymgn wsngcncaya aygcnacnca ygcnacntay  180
acntgycaya tggaygtntt ycayttyatg gcngaygaya thttywsngt naayathacn  240
gaycarwsng gnaaytayws ncargartgy ggnwsnttyy tnytngcnga rwsnathaar  300
ccngcnccnc cnttyaaygt nacngtnacn ttywsnggnc artayaayat hwsntggmgn  360
wsngaytayg argayccngc nttytayatg ytnaarggna arytncarta ygarytncar  420
taymgnaaya gnggngaycc ntgggcngtn wsnccnagna gnaarytnat hwsngtngay  480
wsnmgnwsng tnwsnytnyt nccnytngar ttyagnaarg aywsnwsnta ygarytncar  540
gtnmgngcng gnccnatgcc nggnwsnwsn taycarggna cntggwsnga rtggwsngay  600
ccngtnatht tycaracnca rwsngargar ytnaargarg gntggaaycc ncay        664
```

<210> 8
<211> 696
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de polinucleótido degenerada de polipéptido de IL-2Rgamma como se muestra en SEQ ID NO: 4

<221> aspecto misc_
<222> (1)...(696)
<223> n = A, T, C o G

<400> 8

```
ytnaayacna cnathytnac nccnaayggn aaygargaya cnacngcnga yttyttyytn   60
acnacnatgc cnacngayws nytnwsngtn wsnacnytnc cnytnccnga rgtncartgy  120
ttygtnttya aygtngarta yatgaaytgy acntggaayw snwsnwsnga rccncarccn  180
acnaayytna cnytncayta ytggtayaar aaywsngaya aygayaargt ncaraartgy  240
wsncaytayy tnttywsnga rgarathacn wsnggntgyc arytncaraa raargarath  300
cayytntayc aracnttygt ngtncarytn cargayccna grgarccnwg nwgncargcn  360
acncaratgy tnaarytnca raayytngtn athccntggg cnccngaraa yytnacnytn  420
cayaarytnw sngarwsnca rytngarytn aaytggaaya aywgnttyyt naaycaytgy  480
ytngarcayy tngtncarta ywgnacngay tgggaycayw sntggacnga rcarwsngtn  540
gaytaywgnc ayaarttyws nytnccnwsn gtngayggnc araarwgnta yacnttywgn  600
gtnwgnwsna gnttyaaycc nytntgyggn wsngcncarc aytggwsnga rtggwsncay  660
ccnathcayt ggggnwsnaa yacnwsnaar gartay                             696
```

<210> 9
<211> 486
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(486)

<400> 9

```
atg aga tcc agt cct ggc aac atg gag agg att gtc atc tgt ctg atg      48
Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1               5                  10                  15

gtc atc ttc ttg ggg aca ctg gtc cac aaa tca agc tcc caa ggt caa      96
Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
            20                  25                  30

gat cgc cac atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag     144
Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
        35                  40                  45

ctg aaa aat tat gtg aat gac ttg gtc cct gaa ttt ctg cca gct cca     192
Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
    50                  55                  60

gaa gat gta gag aca aac tgt gag tgg tca gct ttt tcc tgt ttt cag     240
Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
65                  70                  75                  80

aag gcc caa cta aag tca gca aat aca gga aac aat gaa agg ata atc     288
Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
                85                  90                  95

aat gta tca att aaa aag ctg aag agg aaa cca cct tcc aca aat gca     336
Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
            100                 105                 110

ggg aga aga cag aaa cac aga cta aca tgc cct tca tgt gat tct tat     384
Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
        115                 120                 125

gag aaa aaa cca ccc aaa gaa ttc cta gaa aga ttc aaa tca ctt ctc     432
Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
    130                 135                 140

caa aag atg att cat cag cat ctg tcc tct aga aca cac gga agt gaa     480
Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

gat tcc                                                            486
Asp Ser
```

<210> 10

<211> 162

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

<210> 11
<211> 1735
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (143)...(1729)

<400> 11

```
ctgcccacct caaaccttca cctcccacca ccaccactcc gagtcccgct gtgactccca     60
cgcccaggag accacccaag tgccccagcc taaagaatgg ctttctgaga aagaccctga    120
aggagtaggt ctgggacaca gc atg ccc cgg ggc cca gtg gct gcc tta ctc      172
                       Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu
                         1               5                  10

ctg ctg att ctc cat gga gct tgg agc tgc ctg gac ctc act tgc tac      220
Leu Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr
                 15                  20                  25

act gac tac ctc tgg acc atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc      268
Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro
             30                  35                  40

aac ccc agc ata ctc agt ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt      316
Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu
         45                  50                  55

cag gac caa gag acc ttc tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc      364
Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr
     60                  65                  70

aca cat ata tgg tac acg tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc      412
Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser
 75                  80                  85                  90

gat gaa gtt ttc att gtc aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc      460
Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser
                 95                 100                 105

caa gag tgt ggc agc ttt gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc      508
Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro
             110                 115                 120

ccc ttg aac gtg act gtg gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg      556
Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp
         125                 130                 135

gac tca gct tat gac gaa ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta      604
```

```
Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu
    140                 145                 150

caa tat gag ctg cag tat cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg      652
Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg
155                 160                 165                 170

ccg gtg acc aag ctg atc tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc      700
Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu
                175                 180                 185

cct gaa gag ttc cac aaa gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca      748
Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala
            190                 195                 200

gcg cct cag cca ggc act tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt      796
Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser
        205                 210                 215

gac ccc gtc atc ttt cag acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg      844
Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp
    220                 225                 230

gac cct cac atg ctg ctg ctc ctg gct gtc ttg atc att gtc ctg gtt      892
Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val
235                 240                 245                 250

ttc atg ggt ctg aag atc cac ctg cct tgg agg cta tgg aaa aag ata      940
Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile
                255                 260                 265

tgg gca cca gtg ccc acc cct gag agt ttc ttc cag ccc ctg tac agg      988
Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg
            270                 275                 280

gag cac agc ggg aac ttc aag aaa tgg gtt aat acc cct ttc acg gcc     1036
Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala
        285                 290                 295

tcc agc ata gag ttg gtg cca cag agt tcc aca aca aca tca gcc tta     1084
Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu
    300                 305                 310
```

```
cat ctg tca ttg tat cca gcc aag gag aag aag ttc ccg ggg ctg ccg     1132
His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro
315                 320                 325                 330

ggt ctg gaa gag caa ctg gag tgt gat gga atg tct gag cct ggt cac     1180
Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His
                335                 340                 345

tgg tgc ata atc ccc ttg gca gct ggc caa gcg gtc tca gcc tac agt     1228
Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser
            350                 355                 360

gag gag aga gac cgg cca tat ggt ctg gtg tcc att gac aca gtg act     1276
Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr
        365                 370                 375

gtg gga gat gca gag ggc ctg tgt gtc tgg ccc tgt agc tgt gag gat     1324
Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp
    380                 385                 390

gat ggc tat cca gcc atg aac ctg gat gct ggc cga gag tct ggc cct     1372
Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro
395                 400                 405                 410

aat tca gag gat ctg ctc ttg gtc aca gac cct gct ttt ctg tct tgc     1420
Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys
                415                 420                 425

ggc tgt gtc tca ggt agt ggt ctc agg ctt gga ggc tcc cca ggc agc     1468
Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser
            430                 435                 440

cta ctg gac agg ttg agg ctg tca ttt gca aag gaa ggg gac tgg aca     1516
Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr
        445                 450                 455

gca gac cca acc tgg aga act ggg tcc cca gga ggg ggc tct gag agt     1564
Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser
    460                 465                 470

gaa gca ggt tcc ccc cct ggt ctg gac atg gac aca ttt gac agt ggc     1612
```

```
Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly
475                 480                 485                 490

ttt gca ggt tca gac tgt ggc agc ccc gtg gag act gat gaa gga ccc      1660
Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro
                495                 500                 505

cct cga agc tat ctc cgc cag tgg gtg gtc agg acc cct cca cct gtg      1708
Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val
            510                 515                 520

gac agt gga gcc cag agc agc tagcat                                  1735
Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser
        525
```

<210> 12

<211> 529

<212> PRT

<213> *mus musculus*

<400> 12

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

```
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
                165                 170                 175
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
            180                 185                 190
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
        195                 200                 205
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
                245                 250                 255
His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
            260                 265                 270
Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
        275                 280                 285
Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
    290                 295                 300
Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
305                 310                 315                 320
Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu
                325                 330                 335
Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu
            340                 345                 350
Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
        355                 360                 365
Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly
    370                 375                 380
Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met
385                 390                 395                 400
Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu
                405                 410                 415
Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser
            420                 425                 430
Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg
        435                 440                 445
Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg
    450                 455                 460
Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro
465                 470                 475                 480
Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys
                485                 490                 495
Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg
            500                 505                 510
Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser
        515                 520                 525
```

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo de consenso del polipéptido WSXWS

<221> VARIANTE
<222> (1)...(5)
<223> Xaa - Cualquier aminoácido

<400> 13

Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Glu-Glu (CEE) Secuencia de aminoácidos etiqueta

<400> 14

Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 15
<211> 1701
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción zalfa11R/IgGgamma1 soluble

<221> CDS
<222> (1)...(1701)

<400> 15

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1               5                  10                  15

ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg      96
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
            20                  25                  30

gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc     144
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
        35                  40                  45

ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc     192
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
    50                  55                  60

tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc     240
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65                  70                  75                  80

tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc     288
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
                85                  90                  95

aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt     336
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
            100                 105                 110

ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act gtg     384
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
        115                 120                 125

acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac     432
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140

cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac     480
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160
```

```
agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc      528
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175

tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa      576
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190

gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc      624
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205

tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag      672
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220

acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac gct agc acc      720
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Ala Ser Thr
225                 230                 235                 240

aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct      768
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
                245                 250                 255

ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa      816
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
            260                 265                 270

ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac      864
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
        275                 280                 285

acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc      912
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
    290                 295                 300

gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc      960
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
305                 310                 315                 320

aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag     1008
```

```
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
                325                 330                 335

ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct    1056
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            340                 345                 350

gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag    1104
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        355                 360                 365

gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg    1152
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    370                 375                 380

gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac    1200
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
385                 390                 395                 400

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac    1248
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                405                 410                 415

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac    1296
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            420                 425                 430

tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc    1344
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        435                 440                 445

cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga    1392
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    450                 455                 460

gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag    1440
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
465                 470                 475                 480

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac    1488
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                485                 490                 495
```

```
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag     1536
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            500                 505                 510

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc     1584
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        515                 520                 525

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca     1632
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    530                 535                 540

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc     1680
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545                 550                 555                 560

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa                                        1701
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565
```

<210> 16

<211> 567

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 16

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

```
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
    130                 135                 140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145                 150                 155                 160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
                165                 170                 175
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
            180                 185                 190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
        195                 200                 205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
    210                 215                 220
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Ala Ser Thr
225                 230                 235                 240
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
                245                 250                 255
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
            260                 265                 270
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
        275                 280                 285
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
    290                 295                 300
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
305                 310                 315                 320
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
                325                 330                 335
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            340                 345                 350
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        355                 360                 365
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    370                 375                 380
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
385                 390                 395                 400
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
                405                 410                 415
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            420                 425                 430
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
        435                 440                 445
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    450                 455                 460
```

```
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
465                 470                 475                 480
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                485                 490                 495
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            500                 505                 510
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        515                 520                 525
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    530                 535                 540
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
545                 550                 555                 560
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                565
```

<210> 17
<211> 1083
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<222> construcción IL-2Rgamma/cadena ligera kappa humana soluble

<221> CDS
<222> (1)...(1083)

<400> 17

```
atg ttg aag cca tca tta cca ttc aca tcc ctc tta ttc ctg cag ctg      48
Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1               5                  10                  15

ccc ctg ctg gga gtg ggg ctg aac acg aca att ctg acg ccc aat ggg      96
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
            20                  25                  30

aat gaa gac acc aca gct gat ttc ttc ctg acc act atg ccc act gac     144
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
        35                  40                  45

tcc ctc agt gtt tcc act ctg ccc ctc cca gag gtt cag tgt ttt gtg     192
```

```
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
 50                  55                  60

ttc aat gtc gag tac atg aat tgc act tgg aac agc agc tct gag ccc      240
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
 65                  70                  75                  80

cag cct acc aac ctc act ctg cat tat tgg tac aag aac tcg gat aat      288
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
                 85                  90                  95

gat aaa gtc cag aag tgc agc cac tat cta ttc tct gaa gaa atc act      336
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
            100                 105                 110

tct ggc tgt cag ttg caa aaa aag gag atc cac ctc tac caa aca ttt      384
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
        115                 120                 125

gtt gtt cag ctc cag gac cca cgg gaa ccc agg aga cag gcc aca cag      432
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
    130                 135                 140

atg cta aaa ctg cag aat ctg gtg atc ccc tgg gct cca gag aac cta      480
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145                 150                 155                 160

aca ctt cac aaa ctg agt gaa tcc cag cta gaa ctg aac tgg aac aac      528
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
                165                 170                 175

aga ttc ttg aac cac tgt ttg gag cac ttg gtg cag tac cgg act gac      576
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
            180                 185                 190

tgg gac cac agc tgg act gaa caa tca gtg gat tat aga cat aag ttc      624
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
        195                 200                 205

tcc ttg cct agt gtg gat ggg cag aaa cgc tac acg ttt cgt gtt cgg      672
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
    210                 215                 220
```

```
agc cgc ttt aac cca ctc tgt gga agt gct cag cat tgg agt gaa tgg      720
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
225                 230                 235                 240

agc cac cca atc cac tgg ggg agc aat act tca aaa gag aat act gtg      768
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Thr Val
                245                 250                 255

gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa      816
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
            260                 265                 270

tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga      864
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
        275                 280                 285

gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac      912
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
    290                 295                 300

tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc      960
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
305                 310                 315                 320

ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa     1008
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
                325                 330                 335

gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca     1056
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
            340                 345                 350

aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag                                 1083
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
        355                 360
```

<210> 18

<211> 360

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 18

```
Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
 1               5                  10                  15
Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
            20                  25                  30
Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
        35                  40                  45
Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
    50                  55                  60
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65                  70                  75                  80
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
                85                  90                  95
Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
            100                 105                 110
Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
        115                 120                 125
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
    130                 135                 140
Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145                 150                 155                 160
Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
                165                 170                 175
Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
            180                 185                 190
Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
        195                 200                 205
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
    210                 215                 220
Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
225                 230                 235                 240
Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Thr Val
                245                 250                 255
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
            260                 265                 270
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
        275                 280                 285
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
    290                 295                 300
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
305                 310                 315                 320
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
                325                 330                 335
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
            340                 345                 350
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        355                 360
```

<210> 19

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> Cebador de oligonucleótido ZC19905

<400> 19

acaggatccg tcagcatgcc gcgtggctgg gccgcc 36

<210> 20
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19906

<400> 20

acagaattct tagctggcct ggggtccagg cgt 33

<210> 21
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19931

<400> 21

ggttggtacc gcaagatgcc gcgtggctgg gccgcc 36

<210> 22
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19932

<400> 22

cggaggatcc gtgagggttc agccttcc 29

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácido etiqueta FLAG

<400> 23

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 24
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región flanqueante de vector de expansión de cebador de oligonucleótido y el extremo 5' del zalfa11

<400> 24

tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc agggaattca tcgatagtgc cgcgtggctg 60
ggccgc 66

<210> 25
<211> 699
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

gagcccagat cttcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgag 60
gggcaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtacgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc catcctccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 699

<210> 26
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Primer cebador de oligonucleótido que extiende el extremo 3' del dominio extracelular de zalfa11 y el extremo 5' de Fc4

<400> 26

gcacggtggg catgtgtgag ttttgtctga agatctgggc tcgtgagggt tccagccttc 60
ct 62

<210> 27
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segundo cebador de oligonucleótido que extiende el extremo 3' del dominio extracelular de zalfa11 y el extremo 5' de Fc4

<400> 27

agacccagtc agaggagtta aaggaaggct ggaaccctca cgagcccaga tcttcagaca 60
a 61

<210> 28

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de oligonucleótido que extiende el extremo 3' de Fc4 y la región flanqueante del vector

<400> 28

gtgggcctct ggggtgggta caaccccaga gctgttttaa tctagattat ttaccccgag 60
acaggga 67

<210> 29

<211 < 1821

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica fusión MBP-receptor soluble zalfa11 humano

<221> CDS

<222> (1)...(1821)

<400> 29

atg aaa atc gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat aaa 48
Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
1 5 10 15

ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat acc 96
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
20 25 30

gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa ttc 144
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
35 40 45

cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg gca 192
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
50 55 60

cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa atc 240
His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
65 70 75 80

acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg gat 288

```
Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
                  85                  90                  95

gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt gaa      336
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
            100                 105                 110

gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca aaa      384
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys
        115                 120                 125

acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa ggt      432
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly
    130                 135                 140

aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg ccg      480
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
145                 150                 155                 160

ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc aag      528
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
                165                 170                 175

tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg ggt      576
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
            180                 185                 190

ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca gac      624
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
        195                 200                 205

acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca gcg      672
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
    210                 215                 220

atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc aaa      720
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
225                 230                 235                 240

gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca tcc      768
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
                245                 250                 255
```

```
aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt ccg      816
Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
            260                 265                 270

aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act gat      864
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp
        275                 280                 285

gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta gcg      912
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
    290                 295                 300

ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc gcc      960
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala
305                 310                 315                 320

acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg cag     1008
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln
                325                 330                 335

atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc gcc     1056
Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
            340                 345                 350

agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act aat     1104
Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
        355                 360                 365

tcg agc tcc cac cat cac cat cac cac gcg aat tcg gta ccg ctg gtt     1152
Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val
    370                 375                 380

ccg cgt gga tcc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag     1200
Pro Arg Gly Ser Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln
385                 390                 395                 400

acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc     1248
Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu
                405                 410                 415

acc ctt acc tgg caa gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc     1296
```

```
Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr
            420                 425                 430

tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac   1344
Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr
        435                 440                 445

acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt   1392
Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser
    450                 455                 460

gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc   1440
Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser
465                 470                 475                 480

ttt ctc ctg gct gag agc atc aag ccg gct ccc cct ttc aac gtg act   1488
Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr
                485                 490                 495

gtg acc ttc tca gga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa   1536
Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu
            500                 505                 510

gac cct gcc ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag   1584
Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln
        515                 520                 525

tac agg aac cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg   1632
Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu
    530                 535                 540

atc tca gtg gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc   1680
Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg
545                 550                 555                 560

aaa gac tcg agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc   1728
Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly
                565                 570                 575

tcc tcc tac cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt   1776
Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe
            580                 585                 590

cag acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac tag        1821
Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His *
        595                 600                 605
```

<210> 30

<211> 606

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 30

```
Met Lys Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
 1               5                  10                  15
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
            20                  25                  30
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
        35                  40                  45
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
    50                  55                  60
His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
65                  70                  75                  80
Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
                85                  90                  95
Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
            100                 105                 110
Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys
        115                 120                 125
Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly
    130                 135                 140
Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
145                 150                 155                 160
Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
                165                 170                 175
Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
            180                 185                 190
Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
        195                 200                 205
Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
    210                 215                 220
Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
225                 230                 235                 240
Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
                245                 250                 255
```

Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
260 265 270
Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp
275 280 285
Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
290 295 300
Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala
305 310 315 320
Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln
325 330 335
Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
340 345 350
Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
355 360 365
Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val
370 375 380
Pro Arg Gly Ser Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln
385 390 395 400
Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu
405 410 415
Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr
420 425 430
Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr
435 440 445
Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser
450 455 460
Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser
465 470 475 480
Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr
485 490 495
Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu
500 505 510
Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln
515 520 525
Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu
530 535 540
Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg
545 550 555 560
Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly
565 570 575
Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe
580 585 590
Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His
595 600 605

<210> 31

<211> 657

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 31

tgcccgacc tcgtctgcta caccgattac ctccagacgg tcatctgcat cctggaaatg 60
tggaacctcc acccccagcac gctcaccctt acctggcaag accagtatga agagctgaag 120
gacgaggcca cctcctgcag cctccacagg tcggcccaca atgccacgca tgccacctac 180
acctgccaca tggatgtatt ccacttcatg gccgacgaca ttttcagtgt caacatcaca 240
gaccagtctg gcaactactc ccaggagtgt ggcagctttc tcctggctga gagcatcaag 300
ccggctcccc ctttcaacgt gactgtgacc ttctcaggac agtataatat ctcctggcgc 360
tcagattacg aagaccctgc cttctacatg ctgaagggca agcttcagta tgagctgcag 420
tacaggaacc gcggagaccc ctgggctgtg agtccgagga gaaagctgat ctcagtggac 480
tcaagaagtg tctccctcct ccccctggag ttccgcaaag actcgagcta tgagctgcag 540
gtgcgggcag ggcccatgcc tggctcctcc taccagggga cctggagtga atggagtgac 600
ccggtcatct ttcagacccg gtcagaggag ttaaaggaag gctggaaccc tcactag 657

<210> 32
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC20187

<400> 32

tcaccacgcg aattcggtac cgctggttcc gcgtggatcc tgccccgacc tcgtctgcta 60
caccg 65

<210> 33
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC20185

<400> 33

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctagtgaggg ttccagcctt 60
cctttaac 68

<210> 34
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19372

<400> 34

tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc 40

<210> 35
<211> 60
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19352

<400> 35

acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg 60

<210> 36
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19352

<400> 36

actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcggaa ccagcggtac cgaattcgcg 60

<210> 37
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19371

<400> 37

acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg 42

<210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19907

<400> 38

atggatgtat tccacttcat ggcc 24

<210> 39
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC19908

<400> 39

actgtcaaac gtgtccatat ccag 24

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC22277

<400> 40

ccaggagtgt ggcagctttc 20

<210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC22276

<400> 41

gcttgccctt cagcatgtag a 21

<210> 42
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda TaqMan de zalfa11, ZG31

<400> 42

cggctccccc tttcaacgtg act 23

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido, cebadar delantero de rARN

<400> 43

cggctaccac atccaaggaa 20

<210> 44
<211> 18

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido, cebador inverso de rARN

<400> 44

gctggaatta ccgcggct 18

<210> 45
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda TaqMan de rARN

<400> 45

tgctggcacc agacttgccc tc 22

<210> 46
<211> 3072
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (54)...(491)

<400> 46

```
gagaaccaga ccaaggccct gtcatcagct cctggagact cagttctggt ggc atg        56
                                                            Met
                                                             1
gag agg acc ctt gtc tgt ctg gta gtc atc ttc ttg ggg aca gtg gcc       104
Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val Ala
          5                  10                  15
cat aaa tca agc ccc caa ggg cca gat cgc ctc ctg att aga ctt cgt       152
His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg
      20                  25                  30
cac ctt att gac att gtt gaa cag ctg aaa atc tat gaa aat gac ttg       200
His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu
  35                  40                  45
gat cct gaa ctt cta tca gct cca caa gat gta aag ggg cac tgt gag       248
Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu
50                  55                  60                  65
cat gca gct ttt gcc tgt ttt cag aag gcc aaa ctc aag cca tca aac       296
His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn
                70                  75                  80
cct gga aac aat aag aca ttc atc att gac ctc gtg gcc cag ctc agg       344
Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg
            85                  90                  95
```

```
agg agg ttg cct gcc agg agg gga gga aag aaa cag aag cac ata gct     392
Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala
        100                 105                 110

aaa tgc cct tcc tgt gat tcg tat gag aaa agg aca ccc aaa gaa ttc     440
Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe
    115                 120                 125

cta gaa aga cta aaa tgg ctc ctt caa aag atg att cat cag cat ctc     488
Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu
130                 135                 140                 145

tcc tagaacacat aggaccccgaa gattcctgag gatccgagaa gattccccgag        541
Ser

gactgaggag acgccggaca ctatagacgc tcacgaatgc aggagtacat cttgcctctt   601
gggattgcaa gtggagaagt acgatacgtt atgataagaa caactcagaa aagctatagg   661
ttaagatcct ttcgcccatt aactaagcag acattgtggt tccctgcaca gactccatgc   721
tgtcaacatg gaaaatctca actcaacaag agcccagctt ccagtgtcag ggatttctgg   781
tgcttctcaa gctgtggctt catcttattg cccaactgtg acattctttg attggaaggg   841
gaaaactaaa gcttttagca aaatacagc tagggaattt gtcgatctgc gagagtaaga   901
cctcttatga tcctaacgga atgatgtaag ctggaaataa taagcataag atgaaattga   961
aaattgaagt ctttattctt taagaaaaac tttgtacttg aaagcatgtc tgaagagttt  1021
actcattacc acaaacatct agcatattga taactaacat ctttatactc tacaagagag  1081
gctttccaga taggtacagt ttttcttctc tattaggtct atcaaaattt aacctattat  1141
gagggtcacc cctggctttc actgtttttc taaagaggca agggtgtagt aagaagcagg  1201
cttaagttgc cttcctccca atgtcaagtt cctttataag ctaatagttt aatcttgtga  1261
agatggcaat gaaagcctgt ggaagtgcaa acctcactat cttctggagc caagtagaat  1321
tttcaagttt gtagctctca cctcaagtgg ttatgggtgt cctgtgatga atctgctagc  1381
tccagcctca gtctcctctc ccacatcctt tcctttcttt cctctttgaa acttctaaga  1441
aaaagcaatc caaacaagtt cagcacttaa gacacattgc atgcacactt ttgataagtt  1501
aaatccaacc atctatttaa aatcaaaatc aggagatgag ccaagagacc agaggttctg  1561
ttccagtttt aaacagactt ttactgaaca tcccaatctt ttaaccacag aggctaaatt  1621
gagcaaatag ttttgccatt tgatataatt tccaacagta tgtttcaatg tcaagttaka  1681
aagtctacaa agctatttttc cctggagtgg tatcatcgct ttgagaattt cttatggtta  1741
aaatggatct gagatccaag catggcctgg gggatggttt tgatctaagg aaaaaggtgt  1801
ctgtacctca cagtgccttt aaaacaagca gagatcccgt gtaccgccct aagatagcac  1861
agactagtgt taactgattc ccagaaaagt gtcacaatca gaaccaacgc attctcttaa  1921
actttaaaaa tatgtattgc aaagaacttg tgtaactgta aatgtgtgac tgttgatgac  1981
attatacaca catagcccac gtaagtgtcc aatggtgcta gcattggttg ctgagtttgc  2041
tgctcgaaag ctgaagcaga gatgcagtcc ttcacaaagc aatgatggac agagagggga  2101
gtctccatgt tttattcttt tgttgttttct ggctgtgtaa ctgttgactt cttgacattg  2161
```

```
tgatttttat atttaagaca atgtatttat tttggtgtgt ttattgttct agcctttaa   2221
atcactgaca atttctaatc aagaagtaca aataattcaa tgcagcacag gctaagagct   2281
tgtatcgttt ggaaaagcca gtgaaggctt ctccactagc catgggaaag ctacgcttta   2341
gagtaaacta gacaaaattg cacagcagtc ttgaacctct ctgtgctcaa gactcagcca   2401
gtcctttgac attattgttc actgtgggtg ggaacacatt ggacctgaca cactgttgtg   2461
tgtccatgaa ggttgccact ggtgtaagct ttttttggtt ttcattctct tatctgtaga   2521
acaagaatgt ggggctttcc taagtctatt ctgtatttta ttctgaactt cgtatgtctg   2581
agttttaatg ttttgagtac tcttacagga acacctgacc acacttttga gttaaatttt   2641
atcccaagtg tgatatttag ttgttcaaaa agggaaggga tatacataca tacatacata   2701
catacataca tatatatata tatatataca tatatatata tatatatatg tatatatata   2761
tatatatagg gagagagaga gagagagaga gagaaagaga gagaggttgt tgtaggtcat   2821
aggagttcag aggaaatcag ttatggccgt taatactgta gctgaaagtg ttttctttgt   2881
gaataaattc atagcattat tgatctatgt tattgctctg ttttatttac agtcacacct   2941
gagaatttag ttttaatatg aatgatgtac tttataactt aatgattatt tattatgtat   3001
ttggttttga atgtttgtgt tcatggcttc ttatttaaga cctgatcata ttaaatgcta   3061
cccagtccgg a                                                       3072
```

<210> 47

<211> 146

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 47

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

<210> 48

<211> 100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12749

<400> 48

gtaccttccc gtaaatcccc ccccttcccg gaattacacc cgcgtatttc ccagaaaagg 60
aactgtagat ttctaggaat tcaatccctg gccacgcgtc 100

<210> 49
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12748

<400> 49

tcgagacgcg tggccaagga ttgaattcct agaaatctac agttcctttt ctgggaaata 60
cgcgggtgta attccgggaa gggagggat ttacgggaag 100

<210> 50
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC11450

<400> 50

acttgtggaa ttcgctagca ccaagggccc atcggt 36

<210> 51
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC 11443

<400> 51

gcctagaacg cgttcattta cccggagaca gg

<210> 52
<211> 8
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC11440

<400> 52

aattgaga

<210> 53
<211> 8
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC11441

<400> 53

cgcgtctc

<210> 54
<211> 37
<212 ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC11501

<400> 54

gtcacttgaa ttcggtaccg cctctgttgt gtgcctg

<210> 55
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC11451

<400> 55

gacctgaacg cgtctaacac tctcccctgt tg 32

<210> 56
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC24052

<400> 56

tcagtcggaa ttcgcagaag ccatgccgcg tggctgggcc g 41

<210> 57
<211> 34

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC24053

<400> 57

ctgtgacgct agcgtgaggg ttccagcctt cctt 34

<210> 58
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12834

<400> 58

tcagtcggaa ttcgcagaag ccatgttgaa gccatcatta c 41

<210> 59
<211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC12831

<400> 59

aagacggtac cagatttcaa ctgctcatca gatggcggga agatgaagac agatggtgca 60
gccacagtag gattctcttt tgaagtattg 90

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC23684

<400> 60

tcacccttac ctggcaagac 20

<210> 61
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC23656

<400> 61

taatacgact cactataggg agggggagac acttcttgag tcc 43

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC23685

<400> 62

aggtctgaat cccgactctg 20

<210> 63
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC23657

<400> 63

taatacgact cactataggg aggacgtaat tggtgtttaa taa 43

<210> 64
<211> 1707
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1707)

<400> 64

```
atg ccg cgt ggc tgg gcc gcc ccc ttg ctc ctg ctg ctg ctc cag gga      48
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1               5                  10                  15

gcc ctc gag ggg atg gag agg aag ctc tgc agt ccc aag cca ccc ccc      96
Ala Leu Glu Gly Met Glu Arg Lys Leu Cys Ser Pro Lys Pro Pro Pro
            20                  25                  30

acc aag gcc tct ctc ccc act gac cct cca ggc tgg ggc tgc ccc gac     144
Thr Lys Ala Ser Leu Pro Thr Asp Pro Pro Gly Trp Gly Cys Pro Asp
        35                  40                  45

ctc gtc tgc tac acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa     192
Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu
    50                  55                  60

atg tgg aac ctc cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg ata ctt tct     240
Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Ile Leu Ser
65                  70                  75                  80

aat aat act ggg tgc tat atc aag gac aga aca ctg gac ctc agg caa     288
Asn Asn Thr Gly Cys Tyr Ile Lys Asp Arg Thr Leu Asp Leu Arg Gln
                85                  90                  95

gac cag tat gaa gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac     336
```

```
Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His
            100                 105                 110

agg tcg gcc cac aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat      384
Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp
        115                 120                 125

gta ttc cac ttc atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca gac      432
Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp
    130                 135                 140

cag tct ggc aac tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag      480
Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu
145                 150                 155                 160

agc aga cag tat aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc      528
Ser Arg Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala
                165                 170                 175

ttc tac atg ctg aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac      576
Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn
            180                 185                 190

cgg gga gac ccc tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg      624
Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val
        195                 200                 205

gac tca aga agt gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg      672
Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser
    210                 215                 220

agc tat gag ctg cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac      720
Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr
225                 230                 235                 240

cag ggg acc tgg agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag      768
Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln
                245                 250                 255

tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac cct cac ctg ctg ctt ctc ctc      816
Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu Leu Leu
            260                 265                 270
```

```
ctg ctt gtc ata gtc ttc att cct gcc ttc tgg agc ctg aag acc cat      864
Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys Thr His
        275                 280                 285

cca ttg tgg agg cta tgg aag aag ata tgg gcc gtc ccc agc cct gag      912
Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu
    290                 295                 300

cgg ttc ttc atg ccc ctg tac aag ggc tgc agc gga gac ttc aag aaa      960
Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys
305                 310                 315                 320

tgg gtg ggt gca ccc ttc act ggc tcc agc ctg gag ctg gga ccc tgg     1008
Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp
                325                 330                 335

agc cca gag gtg ccc tcc acc ctg gag gtg tac agc tgc cac cca cca     1056
Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro
            340                 345                 350

cgg agc ccg gcc aag agg ctg cag ctc acg gag cta caa gaa cca gca     1104
Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala
        355                 360                 365

gag ctg gtg gag tct gac ggt gtg ccc aag ccc agc ttc tgg ccg aca     1152
Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr
    370                 375                 380

gcc cag aac tcg ggg ggc tca gct tac agt gag gag agg gat cgg cca     1200
Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
385                 390                 395                 400

tac ggc ctg gtg tcc att gac aca gtg act gtg cta gat gca gag ggg     1248
Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly
                405                 410                 415

cca tgc acc tgg ccc tgc agc tgt gag gat gac ggc tac cca gcc ctg     1296
Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu
            420                 425                 430

gac ctg gat gct ggc ctg gag ccc agc cca ggc cta gag gac cca ctc     1344
Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu
        435                 440                 445
```

```
ttg gat gca ggg acc aca gtc ctg tcc tgt ggc tgt gtc tca gct ggc     1392
Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly
    450                 455                 460

agc cct ggg cta gga ggg ccc ctg gga agc ctc ctg gac aga cta aag     1440
Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys
465                 470                 475                 480

cca ccc ctt gca gat ggg gag gac tgg gct ggg gga ctg ccc tgg ggt     1488
Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly
                485                 490                 495

ggc cgg tca cct gga ggg gtc tca gag agt gag gcg ggc tca ccc ctg     1536
Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu
            500                 505                 510

gcc ggc ctg gat atg gac acg ttt gac agt ggc ttt gtg ggc tct gac     1584
Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp
        515                 520                 525

tgc agc agc cct gtg gag tgt gac ttc acc agc ccc ggg gac gaa gga     1632
Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly
    530                 535                 540

ccc ccc cgg agc tac ctc cgc cag tgg gtg gtc att cct ccg cca ctt     1680
Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu
545                 550                 555                 560

tcg agc cct gga ccc cag gcc agc taa                                 1707
Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser  *
                565
```

<210> 65

<211> 568

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

```
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1               5                  10                  15
Ala Leu Glu Gly Met Glu Arg Lys Leu Cys Ser Pro Lys Pro Pro Pro
            20                  25                  30
Thr Lys Ala Ser Leu Pro Thr Asp Pro Pro Gly Trp Gly Cys Pro Asp
        35                  40                  45
Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu
    50                  55                  60
Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Ile Leu Ser
65                  70                  75                  80
Asn Asn Thr Gly Cys Tyr Ile Lys Asp Arg Thr Leu Asp Leu Arg Gln
                85                  90                  95
Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His
            100                 105                 110
Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp
        115                 120                 125
Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp
    130                 135                 140
Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu
145                 150                 155                 160
Ser Arg Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala
                165                 170                 175
Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn
            180                 185                 190
Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val
        195                 200                 205
Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr
225                 230                 235                 240
Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln
                245                 250                 255
Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu Leu Leu
            260                 265                 270
Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys Thr His
        275                 280                 285
Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu
    290                 295                 300
Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys
305                 310                 315                 320
Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp
                325                 330                 335
Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro
            340                 345                 350
Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala
        355                 360                 365
```

```
Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr
    370                 375                 380
Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
385                 390                 395                 400
Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly
                405                 410                 415
Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu
            420                 425                 430
Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu
        435                 440                 445
Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly
    450                 455                 460
Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys
465                 470                 475                 480
Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly
                485                 490                 495
Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu
            500                 505                 510
Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp
        515                 520                 525
Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly
    530                 535                 540
Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu
545                 550                 555                 560
Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
                565
```

<210> 66

<211> 741

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido degenerado de SEQ ID NO: 69

<221> aspecto misc_

<222> (1)...(741)

<2223> n= A, T, C o G

<400> 66

```
atggarwgna arytntgyws nccnwarccn ccnccnacna argcnwsnyt nccnacngay     60
ccnccnggnt ggggntgycc ngayytngtn tgytayacng aytayytnca racngtnath     120
tgyathytng aratgtggaa yytncayccn wsnacnytns cnytnacntg gathytnwsn     180
aayaayacng gntgytayat haargaygsn acnytngayy tnwgncarga ycartaygar     240
garytnaarg aygargcnac nwsntgywsn ytncaywsnw sngcncayws ygcnacncay     300
gcnacntaya cntgycayat ggaygtntty cayttyatgg cngtaygayat httywangtn     360
aayathacng aycarwsngg naaytaywsn cargartgyg gnwsnttyyt nytngcngar     420
wsnwgncart ayaaysthws ntggagnwsn gaytaygarg aycengcntt ytayatgytn     480
aarggnaary tncartayga rytncartay sgnaaywsng gngaycentg ggcngtnwsn     540
ccnwghwgna arytnathws ngtngaywsn sgnwsngtnw snytnytncc nytngartty     600
wgnaargayw snwsntayga rytncargtn wgngcnggnc cnatgccngg nwsnwsntay     660
carggnacnt ggwsngartg gwsngaycen gtnathttyc aracncarws ngargarytn     720
aargarggnt ggaaycenca y                                               741
```

<210> 67
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Motivo WXXW

<221> VARIANTE
<222> (1)...(4)
<223> Xaa - Cualquier aminoácido

<400> 67

Trp Xaa Xaa Trp
1

<210> 68
<211> 741
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(741)

<400> 68

```
atg gag agg aag ctc tgc agt ccc aag cca ccc ccc acc aag gcc tct      48
Met Glu Arg Lys Leu Cys Ser Pro Lys Pro Pro Pro Thr Lys Ala Ser
 1               5                  10                  15

ctc ccc act gac cct cca ggc tgg ggc tgc ccc gac ctc gtc tgc tac      96
Leu Pro Thr Asp Pro Pro Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr
            20                  25                  30

acc gat tac ctc cag acg gtc atc tgc atc ctg gaa atg tgg aac ctc     144
Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu
        35                  40                  45

cac ccc agc acg ctc acc ctt acc tgg ata ctt tct aat aat act ggg     192
His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Ile Leu Ser Asn Asn Thr Gly
    50                  55                  60

tgc tat atc aag gac aga aca ctg gac ctc agg caa gac cag tat gaa     240
Cys Tyr Ile Lys Asp Arg Thr Leu Asp Leu Arg Gln Asp Gln Tyr Glu
65                  70                  75                  80

gag ctg aag gac gag gcc acc tcc tgc agc ctc cac agg tcg gcc cac     288
Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His
                85                  90                  95

aat gcc acg cat gcc acc tac acc tgc cac atg gat gta ttc cac ttc     336
Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe
            100                 105                 110

atg gcc gac gac att ttc agt gtc aac atc aca gac cag tct ggc aac     384
Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn
        115                 120                 125

tac tcc cag gag tgt ggc agc ttt ctc ctg gct gag agc aga cag tat     432
Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Arg Gln Tyr
    130                 135                 140

aat atc tcc tgg cgc tca gat tac gaa gac cct gcc ttc tac atg ctg     480
Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu
145                 150                 155                 160

aag ggc aag ctt cag tat gag ctg cag tac agg aac cgg gga gac ccc     528
Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro
                165                 170                 175

tgg gct gtg agt ccg agg aga aag ctg atc tca gtg gac tca aga agt     576
Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser
            180                 185                 190
```

```
gtc tcc ctc ctc ccc ctg gag ttc cgc aaa gac tcg agc tat gag ctg      624
Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu
        195                 200                 205

cag gtg cgg gca ggg ccc atg cct ggc tcc tcc tac cag ggg acc tgg      672
Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp
    210                 215                 220

agt gaa tgg agt gac ccg gtc atc ttt cag acc cag tca gag gag tta      720
Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu
225                 230                 235                 240

aag gaa ggc tgg aac cct cac                                          741
Lys Glu Gly Trp Asn Pro His
                245
```

<210> 69
<211> 247
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

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

```
Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro
                165                 170                 175
Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser
            180                 185                 190
Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu
        195                 200                 205
Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp
    210                 215                 220
Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu
225                 230                 235                 240
Lys Glu Gly Trp Asn Pro His
                245
```

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Motivo enlazador de dominio: motivo PAPP

<400> 70

Pro Ala Pro Pro
1

<210> 71
<211> 261
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Receptor soluble variante representativo con enlazador de dominio

<221>
<222> (1)...(261)
<223> Xaa - Cualquier aminoácido

<400> 71

```
Met Glu Arg Lys Leu Cys Ser Pro Lys Pro Pro Pro Thr Lys Ala Ser
 1               5                  10                  15
Leu Pro Thr Asp Pro Pro Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr
            20                  25                  30
Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu
        35                  40                  45
His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Ile Leu Ser Asn Asn Thr Gly
    50                  55                  60
Cys Tyr Ile Lys Asp Arg Thr Leu Asp Leu Arg Gln Asp Gln Tyr Glu
65                  70                  75                  80
Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His
                85                  90                  95
Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe
            100                 105                 110
Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn
        115                 120                 125
Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Xaa Xaa Pro
    130                 135                 140
Ala Pro Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Gln Tyr Asn Ile
145                 150                 155                 160
Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly
                165                 170                 175
Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala
            180                 185                 190
Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser
        195                 200                 205
Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val
    210                 215                 220
Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu
225                 230                 235                 240
Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu
                245                 250                 255
Gly Trp Asn Pro His
            260
```

<210> 72

<211> 1461

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido de proteína de fusión de dominio extracelular de zalfa11 de ratón región Fc de cadena pesada de inmunoglobulina gamma 2a de ratón (zalfa11m-mG2a)

<221> CDS

<222> (1)...(1461)

<400> 72

```
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc      48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15

gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag aaa atc cat gcc gag ttg aga cgc      96
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Lys Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30

ttc cgg aga tgc ctg gac ctc act tgc tac act gac tac ctc tgg acc     144
Phe Arg Arg Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
        35                  40                  45

atc acc tgt gtc ctg gag aca cgg agc ccc aac ccc agc ata ctc agt     192
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
    50                  55                  60

ctc acc tgg caa gat gaa tat gag gaa ctt cag gac caa gag acc ttc     240
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
65                  70                  75                  80

tgc agc cta cac agg tct ggc cac aac acc aca cat ata tgg tac acg     288
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
                85                  90                  95

tgc cat atg cgc ttg tct caa ttc ctg tcc gat gaa gtt ttc att gtc     336
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
            100                 105                 110

aat gtg acg gac cag tct ggc aac aac tcc caa gag tgt ggc agc ttt     384
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
        115                 120                 125

gtc ctg gct gag agc atc aaa cca gct ccc ccc ttg aac gtg act gtg     432
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
    130                 135                 140

gcc ttc tca gga cgc tat gat atc tcc tgg gac tca gct tat gac gaa     480
```

```
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
145                 150                 155                 160

ccc tcc aac tac gtg ctg agg ggc aag cta caa tat gag ctg cag tat      528
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
                165                 170                 175

cgg aac ctc aga gac ccc tat gct gtg agg ccg gtg acc aag ctg atc      576
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
            180                 185                 190

tca gtg gac tca aga aac gtc tct ctt ctc cct gaa gag ttc cac aaa      624
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
        195                 200                 205

gat tct agc tac cag ctg cag gtg cgg gca gcg cct cag cca ggc act      672
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
    210                 215                 220

tca ttc agg ggg acc tgg agt gag tgg agt gac ccc gtc atc ttt cag      720
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
225                 230                 235                 240

acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac cct cac gag ccc aga      768
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Glu Pro Arg
                245                 250                 255

tct ccc aca atc aag ccc tgt cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac      816
Ser Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
            260                 265                 270

ctc ttg ggt gga cca tcc gtc ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat      864
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
        275                 280                 285

gta ctc atg atc tcc ctg agc ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gtg gat      912
Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
    290                 295                 300

gtg agc gag gat gac cca gat gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac      960
Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
305                 310                 315                 320
```

```
gtg gaa gta cac aca gct cag aca caa acc cat aga gag gat tac aac     1008
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
                325                 330                 335

agt act ctc cgg gtg gtc agt gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg     1056
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
            340                 345                 350

atg agt ggc aag gag ttc aaa tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca     1104
Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
        355                 360                 365

gcg ccc atc gag aga acc atc tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct     1152
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
    370                 375                 380

cca cag gta tat gtc ttg cct cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa     1200
Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
385                 390                 395                 400

cag gtc act ctg acc tgc atg gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att     1248
Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
                405                 410                 415

tac gtg gag tgg acc aac aac ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac     1296
Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
            420                 425                 430

act gaa cca gtc ctg gac tct gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag     1344
Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
        435                 440                 445

ctg aga gtg gaa aag aag aac tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt     1392
Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
    450                 455                 460

tca gtg gtc cac gag ggt ctg cac aat cac cac acg act aag agc ttc     1440
Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
465                 470                 475                 480

tcc cgg act ccg ggt aaa taa                                        1461
Ser Arg Thr Pro Gly Lys  *
                485
```

<210> 73

<211> 486

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 73

```
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Lys Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
Phe Arg Arg Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
        35                  40                  45
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
    50                  55                  60
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
65                  70                  75                  80
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
                85                  90                  95
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
            100                 105                 110
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
        115                 120                 125
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
    130                 135                 140
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
145                 150                 155                 160
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
                165                 170                 175
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
            180                 185                 190
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
        195                 200                 205
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
    210                 215                 220
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
225                 230                 235                 240
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Glu Pro Arg
                245                 250                 255
```

```
Ser Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
            260                 265                 270
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
        275                 280                 285
Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
    290                 295                 300
Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
305                 310                 315                 320
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
                325                 330                 335
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
            340                 345                 350
Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
        355                 360                 365
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
    370                 375                 380
Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
385                 390                 395                 400
Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
                405                 410                 415
Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
            420                 425                 430
Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
        435                 440                 445
Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
    450                 455                 460
Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
465                 470                 475                 480
Ser Arg Thr Pro Gly Lys
                485
```

<210> 74
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26644

<400> 74

ggggtcgacg gccggccacc atg 23

<210> 75
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26641

<400> 75

caagtgaggt ccaggcatct ccggaagcgt ctcaa 35

<210> 76
<211> 35
<212> ADN
<213> Secunda artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26642

<400> 76

ttgagacgct tccggagatg cctggacctc acttg 35

<210> 77
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26662

<400> 77

tgtgggagat ctgggctcgt gagggtccca gcctgc 36

<210> 78
<211>30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26643

<400> 78

gagcccagat ctcccacaat caagccctgt 30

<210> 79
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de oligonucleótido ZC26645

<400> 79

aaacgcggcc gcggatccgg c 21

<210> 80
<211> 35

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

```
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
 1               5                  10                  15
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg
            20                  25                  30
Phe Arg Arg
        35
```

<210> 81
<211> 966
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(966)

<400> 81

```
ggg ggc ggg ggc gcc gcg cct acg gaa act cag cca cct gtg aca aat      48
Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val Thr Asn
 1               5                  10                  15

ttg agt gtc tct gtt gaa aac ctc tgc aca gta ata tgg aca tgg aat      96
Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn
            20                  25                  30
```

```
cca ccc gag gga gcc agc tca aat tgt agt cta tgg tat ttt agt cat      144
Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His
        35                  40                  45

ttt ggc gac aaa caa gat aag aaa ata gct ccg gaa act cgt cgt tca      192
Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser
    50                  55                  60

ata gaa gta ccc ctg aat gag agg att tgt ctg caa gtg ggg tcc cag      240
Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu Gln Val Gly Ser Gln
65                  70                  75                  80

tgt agc acc aat gag agt gag aag cct agc att ttg gtt gaa aaa tgc      288
Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys
                85                  90                  95

atc tca ccc cca gaa ggt gat cct gag tct gct gtg act gag ctt caa      336
Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln
            100                 105                 110

tgc att tgg cac aac ctg agc tac atg aag tgt tct tgg ctc cct gga      384
Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu Pro Gly
        115                 120                 125

agg aat acc agt ccc gac act aac tat act ctc tac tat tgg cac aga      432
Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg
    130                 135                 140

agc ctg gaa aaa att cat caa tgt gaa aac atc ttt aga gaa ggc caa      480
Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu Gly Gln
145                 150                 155                 160

tac ttt ggt tgt tcc ttt gat ctg acc aaa gtg aag gat tcc agt ttt      528
Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe
                165                 170                 175

gaa caa cac agt gtc caa ata atg gtc aag gat aat gca gga aaa att      576
Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp Asn Ala Gly Lys Ile
            180                 185                 190

aaa cca tcc ttc aat ata gtg cct tta act tcc cgt gtg aaa cct gat      624
Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp
        195                 200                 205
```

```
cct cca cat att aaa aac ctc tcc ttc cac aat gat gac cta tat gtg      672
Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn Asp Asp Leu Tyr Val
    210                 215                 220

caa tgg gag aat cca cag aat ttt att agc aga tgc cta ttt tat gaa      720
Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe Tyr Glu
225                 230                 235                 240

gta gaa gtc aat aac agc caa act gag aca cat aat gtt ttc tac gtc      768
Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val Phe Tyr Val
                245                 250                 255

caa gag gct aaa tgt gag aat cca gaa ttt gag aga aat gtg gag aat      816
Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn
            260                 265                 270

aca tct tgt ttc atg gtc cct ggt gtt ctt cct gat act ttg aac aca      864
Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr
        275                 280                 285

gtc aga ata aga gtc aaa aca aat aag tta tgc tat gag gat gac aaa      912
Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys
    290                 295                 300

ctc tgg agt aat tgg agc caa gaa atg agt ata ggt aag aag cgc aat      960
Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn
305                 310                 315                 320

tcc aca                                                             966
Ser Thr
```

<210> 82

<211> 322

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

```
Gly Gly Gly Gly Ala Ala Pro Thr Glu Thr Gln Pro Pro Val Thr Asn
 1               5                  10                  15
Leu Ser Val Ser Val Glu Asn Leu Cys Thr Val Ile Trp Thr Trp Asn
            20                  25                  30
```

```
Pro Pro Glu Gly Ala Ser Ser Asn Cys Ser Leu Trp Tyr Phe Ser His
        35                  40                  45
Phe Gly Asp Lys Gln Asp Lys Lys Ile Ala Pro Glu Thr Arg Arg Ser
    50                  55                  60
Ile Glu Val Pro Leu Asn Glu Arg Ile Cys Leu Gln Val Gly Ser Gln
65                  70                  75                  80
Cys Ser Thr Asn Glu Ser Glu Lys Pro Ser Ile Leu Val Glu Lys Cys
                85                  90                  95
Ile Ser Pro Pro Glu Gly Asp Pro Glu Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln
            100                 105                 110
Cys Ile Trp His Asn Leu Ser Tyr Met Lys Cys Ser Trp Leu Pro Gly
        115                 120                 125
Arg Asn Thr Ser Pro Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp His Arg
    130                 135                 140
Ser Leu Glu Lys Ile His Gln Cys Glu Asn Ile Phe Arg Glu Gly Gln
145                 150                 155                 160
Tyr Phe Gly Cys Ser Phe Asp Leu Thr Lys Val Lys Asp Ser Ser Phe
                165                 170                 175
Glu Gln His Ser Val Gln Ile Met Val Lys Asp Asn Ala Gly Lys Ile
            180                 185                 190
Lys Pro Ser Phe Asn Ile Val Pro Leu Thr Ser Arg Val Lys Pro Asp
        195                 200                 205
Pro Pro His Ile Lys Asn Leu Ser Phe His Asn Asp Asp Leu Tyr Val
    210                 215                 220
Gln Trp Glu Asn Pro Gln Asn Phe Ile Ser Arg Cys Leu Phe Tyr Glu
225                 230                 235                 240
Val Glu Val Asn Asn Ser Gln Thr Glu Thr His Asn Val Phe Tyr Val
                245                 250                 255
Gln Glu Ala Lys Cys Glu Asn Pro Glu Phe Glu Arg Asn Val Glu Asn
            260                 265                 270
Thr Ser Cys Phe Met Val Pro Gly Val Leu Pro Asp Thr Leu Asn Thr
        275                 280                 285
Val Arg Ile Arg Val Lys Thr Asn Lys Leu Cys Tyr Glu Asp Asp Lys
    290                 295                 300
Leu Trp Ser Asn Trp Ser Gln Glu Met Ser Ile Gly Lys Lys Arg Asn
305                 310                 315                 320
Ser Thr
```

<210> 83
<211> 951
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(961)

<400> 83

```
gac acc gag ata aaa gtt aac cct cct cag gat ttt gag ata gtg gat      48
Asp Thr Glu Ile Lys Val Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp
 1               5                  10                  15

ccc gga tac tta ggt tat ctc tat ttg caa tgg caa ccc cca ctg tct      96
Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser
            20                  25                  30

ctg gat cat ttt aag gaa tgc aca gtg gaa tat gaa cta aaa tac cga     144
Leu Asp His Phe Lys Glu Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg
        35                  40                  45

aac att ggt agt gaa aca tgg aag acc atc att act aag aat cta cat     192
Asn Ile Gly Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His
    50                  55                  60

tac aaa gat ggg ttt gat ctt aac aag ggc att gaa gcg aag ata cac     240
Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His
65                  70                  75                  80

acg ctt tta cca tgg caa tgc aca aat gga tca gaa gtt caa agt tcc     288
Thr Leu Leu Pro Trp Gln Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser
                85                  90                  95

tgg gca gaa act act tat tgg ata tca cca caa gga att cca gaa act     336
Trp Ala Glu Thr Thr Tyr Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr
            100                 105                 110

aaa gtt cag gat atg gat tgc gta tat tac aat tgg caa tat tta ctc     384
Lys Val Gln Asp Met Asp Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu
        115                 120                 125

tgt tct tgg aaa cct ggc ata ggt gta ctt ctt gat acc aat tac aac     432
Cys Ser Trp Lys Pro Gly Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn
    130                 135                 140

ttg ttt tac tgg tat gag ggc ttg gat cat gca tta cag tgt gtt gat     480
```

```
Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp
145                 150                 155                 160

tac atc aag gct gat gga caa aat ata gga tgc aga ttt ccc tat ttg      528
Tyr Ile Lys Ala Asp Gly Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu
                165                 170                 175

gag gca tca gac tat aaa gat ttc tat att tgt gtt aat gga tca tca      576
Glu Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser
            180                 185                 190

gag aac aag cct atc aga tcc agt tat ttc act ttt cag ctt caa aat      624
Glu Asn Lys Pro Ile Arg Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn
        195                 200                 205

ata gtt aaa cct ttg ccg cca gtc tat ctt act ttt act cgg gag agt      672
Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser
    210                 215                 220

tca tgt gaa att aag ctg aaa tgg agc ata cct ttg gga cct att cca      720
Ser Cys Glu Ile Lys Leu Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro
225                 230                 235                 240

gca agg tgt ttt gat tat gaa att gag atc aga gaa gat gat act acc      768
Ala Arg Cys Phe Asp Tyr Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr
                245                 250                 255

ttg gtg act gct aca gtt gaa aat gaa aca tac acc ttg aaa aca aca      816
Leu Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr
            260                 265                 270

aat gaa acc cga caa tta tgc ttt gta gta aga agc aaa gtg aat att      864
Asn Glu Thr Arg Gln Leu Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile
        275                 280                 285

tat tgc tca gat gac gga att tgg agt gag tgg agt gat aaa caa tgc      912
Tyr Cys Ser Asp Asp Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys
    290                 295                 300

tgg gaa ggt gaa gac cta tcg aag aaa act ttg cta cgt                  951
Trp Glu Gly Glu Asp Leu Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg
305                 310                 315
```

<210> 84

<211> 317

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

```
Asp Thr Glu Ile Lys Val Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp
 1               5                  10                  15
Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser
            20                  25                  30
Leu Asp His Phe Lys Glu Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg
        35                  40                  45
Asn Ile Gly Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His
    50                  55                  60
Tyr Lys Asp Gly Phe Asp Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His
65                  70                  75                  80
Thr Leu Leu Pro Trp Gln Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser
                85                  90                  95
Trp Ala Glu Thr Thr Tyr Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr
            100                 105                 110
Lys Val Gln Asp Met Asp Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu
        115                 120                 125
Cys Ser Trp Lys Pro Gly Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn
    130                 135                 140
Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp
145                 150                 155                 160
Tyr Ile Lys Ala Asp Gly Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu
                165                 170                 175
Glu Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser
            180                 185                 190
Glu Asn Lys Pro Ile Arg Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn
        195                 200                 205
Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser
    210                 215                 220
Ser Cys Glu Ile Lys Leu Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro
225                 230                 235                 240
Ala Arg Cys Phe Asp Tyr Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr
                245                 250                 255
Leu Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr
            260                 265                 270
Asn Glu Thr Arg Gln Leu Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile
        275                 280                 285
Tyr Cys Ser Asp Asp Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys
    290                 295                 300
Trp Glu Gly Glu Asp Leu Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg
305                 310                 315
```

<210> 85
<211> 519
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CD>
<222> (1)...(519)

<400> 85

```
atc acg tgc cct ccc ccc atg tcc gtg gaa cac gca gac atc tgg gtc      48
Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1               5                  10                  15

aag agc tac agc ttg tac tcc agg gag cgg tac att tgt aac tct ggt      96
Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly
            20                  25                  30

ttc aag cgt aaa gcc ggc acg tcc agc ctg acg gag tgc gtg ttg aac     144
Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
        35                  40                  45

aag gcc acg aat gtc gcc cac tgg aca acc ccc agt ctc aaa tgc att     192
Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
    50                  55                  60

aga gac cct gcc ctg gtt cac caa agg cca gcg cca ccc tcc aca gta     240
Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

acg acg gca ggg gtg acc cca cag cca gag agc ctc tcc cct tct gga     288
Thr Thr Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly
                85                  90                  95

aaa gag ccc gca gct tca tct ccc agc tca aac aac aca gcg gcc aca     336
Lys Glu Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr
            100                 105                 110

aca gca gct att gtc ccg ggc tcc cag ctg atg cct tca aaa tca cct     384
Thr Ala Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro
        115                 120                 125

tcc aca gga acc aca gag ata agc agt cat gag tcc tcc cac ggc acc     432
Ser Thr Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr
    130                 135                 140

ccc tct cag aca aca gcc aag aac tgg gaa ctc aca gca tcc gcc tcc     480
Pro Ser Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser
145                 150                 155                 160

cac cag ccg cca ggt gtg tat cca cag ggc cac agc gac                 519
His Gln Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp
                165                 170
```

<210> 86

<211> 173

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 86

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